

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARIANNE NEVES MANJAVACHI

**PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DOR CRÔNICA**

Florianópolis
2015

MARIANNE NEVES MANJAVACHI

**PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DOR CRÔNICA**

Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Doutor em
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. João B.
Calixto
Coorientador: Prof. Dr. Robson
da Costa

Florianópolis
2015

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

Ao professor João Batista Calixto, pela orientação e ensinamentos durante os anos de iniciação científica, mestrado e doutorado;

Ao professor Robson da Costa, pelo incentivo, dedicação e parceria no desenvolvimento deste trabalho, sobretudo, por sua amizade;

À Gabriela Trevisan dos Santos, pela ajuda nos experimentos de injeção intratecal desta tese;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial a professora Thereza Christina Monteiro de Lima, por terem contribuído na minha formação;

Aos colegas de laboratório, em especial à Maíra Assunção Bicca, pela convivência e aprendizado diário;

Ao Pedro Paulo de Souza, técnico do biotério setorial, e às técnicas de laboratório Aline Venancio, Ana Carolina Machado e Juliana Gonçalves;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro;

Aos meus pais, Cleide e Ademir, pela confiança, apoio e esforços infindáveis. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos;

Ao meu companheiro, Diego, por sempre estar do meu lado e dividir mais essa importante etapa da minha caminhada. Grata por todo apoio, confiança, amor e companheirismo;

Aos amigos do Comitê e Cobra Coral, parceiros de vida. Obrigada pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos.

RESUMO

A dor crônica é um problema de saúde grave, que afeta milhões de pessoas por todo o mundo. No entanto, não há terapia farmacológica disponível para o tratamento adequado de pacientes com dor crônica. Estudos recentes fornecem evidências convincentes de que a neuroinflamação desempenha um papel fundamental na patogênese da dor crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 na patogênese da dor neuropática, utilizando para isso diferentes modelos experimentais. A injeção intraneural (i.n.) de CXCL1 em camundongos causou hiperalgesia mecânica e térmica (ao calor) de longa duração, associada com migração de neutrófilos para o local da injeção no nervo ciático. A depleção destas células, após o tratamento dos animais com vimblastina, reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela quimiocina. A administração da CXCL1 no nervo ciático de camundongos aumentou os níveis teciduais da interleucina 1β (IL- 1β), interleucina 6 (IL-6) e da quimiocina CCL2, mas não do fator de necrose tumoral α (TNF- α). A participação da CXCL1 no modelo de ligação parcial do nervo ciático (LPNC) também foi evidenciada, uma vez que após a lesão os níveis teciduais e a expressão do RNAm para a CXCL1 encontraram-se aumentados tanto no nervo ciático quanto na medula espinhal de camundongos. O tratamento com anticorpo anti-CXCL1 no momento, ou 4 dias após a LPNC reduziu de maneira significativa tanto a hiperalgesia mecânica como a térmica (ao calor). Além disso, a administração intratecal (i.t.) do anticorpo anti-CXCL1 foi eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC, sugerindo a participação central desta quimiocina no desenvolvimento da dor neuropática. Estendendo os resultados anteriores, foi demonstrado que a participação da CXCL1 nos mecanismos envolvidos na LPNC depende da migração de neutrófilos, bem como da liberação de mediadores inflamatórios, especialmente da IL- 1β e IL-6. Finalmente, avaliou-se o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 em um modelo de dor neuropática não relacionado a lesão direta de nervos, a neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel (PTX), um quimioterápico de amplo uso clínico. A administração repetida de PTX induziu o aumento significativo da expressão do RNAm para CXCL1 tanto no GRD como na medula espinhal, bem como aumentou os níveis teciduais desta quimiocina na medula espinhal. O tratamento sistêmico com o anticorpo anti-CXCL1, mas não o com antagonista do receptor CXCR2, reduziu a hiperalgesia mecânica

instalada induzida pelo PTX. De modo relevante, o tratamento preventivo destas drogas quando administrados pela via intratecal inibiram de maneira significativa a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Estes resultados sugerem a participação da quimiocina CXCL1 e do seu receptor expressos na medula espinhal no desenvolvimento da neuropatia induzida pelo PTX. Ainda os mecanismos centrais envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX parecem depender da ativação da via de sinalização PI3K/AKT, e não das enzimas PLC e PKC. Os resultados do presente estudo demonstraram que a quimiocina participa dos mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção da dor crônica em modelos experimentais. Desta maneira, estratégias que contribuam para inibir a ação e/ou a liberação desta quimiocina poderiam constituir ferramentas terapêuticas importantes para o tratamento da dor neuropática em seres humanos.

ABSTRACT

Chronic pain is a rising health problem that is predicted to affect millions of people worldwide. However, there are so far no available pharmacotherapies providing satisfactory pain relief for patients with persistent pain. Recent studies provide compelling evidence that neuroinflammation plays a key role in the pathogenesis of chronic pain. In this study we sought to evaluate the involvement of chemokine CXCL1 in the pathogenesis of neuropathic pain in different experimental models. Intraneural injection (i.n.) of CXCL1 induced thermal and mechanical hyperalgesia in mice and caused neutrophil migration into the mouse sciatic nerve. Depletion of these cells in animals pre-treated with vinblastine significantly reduced the mechanical hyperalgesia induced by the chemokine. Administration of CXCL1 in the sciatic nerve of mice increased tissue levels of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and chemokine CCL2, but not the tumor necrosis factor α (TNF- α). CXCL1 role in the partial ligation of the sciatic nerve (PLSN) model was also demonstrated since after surgery their tissue levels and CXCL1 mRNA expression increased in the sciatic nerve and spinal cord tissues. Treatment with anti-CXCL1 antibody at the moment or 4 days after surgery reduced mechanical and thermal hyperalgesia induced by PLSN. Furthermore, the intratecal (i.t.) injection of anti-CXCL1 antibody also inhibited mechanical hyperalgesia induced by PLSN, suggesting the central involvement of this chemokine in the development of neuropathic pain. The participation of the CXCL1 in the PLSN model also depends on neutrophils migration and release of inflammatory mediators such as IL-1 β and IL-6. Finally we evaluated the involvement of CXCL1 chemokine in a neuropathic pain model that was not dependent on direct nerve injuries, the neuropathic pain model induced by the chemotherapy paclitaxel (PTX). Repeated administration of PTX induced a significant increase in expression of CXCL1 mRNA in spinal cord and DRG, as well as increased the tissue levels of this chemokine in the spinal cord. Systemic treatment with anti-CXCL1 antibody, but not the CXCR2 receptor antagonist, reduced the installed mechanical hyperalgesia induced by PTX. Preventive treatment of these drugs when administered by intratecal route significantly inhibited the mechanical hyperalgesia induced by PTX. These results suggest the involvement of CXCL1 chemokine and its receptor expressed in the spinal cord in the development of neuropathy induced by PTX. Furthermore, central mechanisms involved in the mechanical hyperalgesia induced PTX

appear to depend on activation of the PI3K/AKT signaling pathway, and independent of PLC and PKC enzymes activation. The results of this study demonstrated the role of CXCL1 in the establishment and maintenance of chronic pain in experimental models. Thus, strategies to inhibit the action and/or the release of this chemokine might be an important therapeutic tool for the treatment of neuropathic pain in humans.

Lista de Figuras

- Figura 1:** A quimiocina CXCL1 induz hiperalgesia mecânica após a injeção no nervo ciático de camundongos.....
- Figura 2:** A quimiocina CXCL1 induz hiperalgesia térmica ao calor transitória após a injeção no nervo ciático de camundongos.....
- Figura 3:** Efeito do tratamento com gabapentina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n. de CXCL1.....
- Figura 4:** Efeito do tratamento com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraneural de CXCL1.....
- Figura 5:** A hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n. de CXCL1 depende da migração de neutrófilos.....
- Figura 6:** A injeção i.n. da quimiocina CXCL1 aumentou os níveis da citocina IL-1 β , IL-6 e CCL2, mas não os de TNF- α no nervo ciático de camundongos.....
- Figura 7:** Avaliação do envolvimento de produtos de ciclooxigenases e da liberação de catecolaminas nas respostas nociceptivas induzidas pela administração i.n. de CXCL1.....
- Figura 8:** Expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal após LPNC em camundongos.....
- Figura 9:** Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático e medula espinhal após LPNC em camundongos.....

- Figura 10:** A LPNC induz aumento da migração de neutrófilos tanto na periferia, como na medula espinhal.....
- Figura 11:** A depleção de neutrófilos reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....
- Figura 12:** Efeito do tratamento preventivo com anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC.....
- Figura 13:** Efeito do tratamento local com o anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC.....
- Figura 14:** Efeito do tratamento com o anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC.....
- Figura 15:** A inibição espinhal de CXCL1 diminui a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....
- Figura 16:** O tratamento com anticorpo anti-CXCL1 reduz os níveis de IL-1 β e IL-6, mas não os de CCL2 e TNF- α no nervo ciático de camundongos após a LPNC.....
- Figura 17:** Expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 no GDR e na medula espinhal após o tratamento com PTX em camundongos.....
- Figura 18:** Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal após o tratamento com PTX em camundongos.....
- Figura 19:** Comportamentos de dor neuropática induzida pelo PTX em camundongos tratados com anticorpo anti-CXCL1 e SB225002.....

- Figura 20:** Comportamentos de dor neuropática induzida pelo PTX em camundongos tratados com anticorpo anti-CXCL1 e SB225002.....
- Figura 21:** A quimiocina CXCL1 liberada na medula espinhal, bem como seu receptor expresso na medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX.....
- Figura 22:** A quimiocina CXCL1 liberada na medula espinhal, bem como seu receptor expresso na medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX.....
- Figura 23:** Efeito do tratamento i.t. preventivo com os inibidores da PLC, U73122 e PKC, GF109203X sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela neuropatia periférica induzida pelo PTX.....
- Figura 24:** Efeito do tratamento i.t. preventivo com os inibidores da PI3K, wortmannin e PI3K γ , AS605240, sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela neuropatia periférica induzida pelo PTX.....

Lista de abreviaturas

COX	-	Ciclooxygenase
g	-	Grama
GRD	-	Gânglio da raiz dorsal
GT	-	Gânglio trigeminal
h	-	Horas
IASP	-	Associação Internacional do Estudo da Dor
IL-1β	-	Interleucina 1 beta
IL-6	-	Interleucina 6
IL-17	-	Interleucina 17
i.n.	-	Intraneural
i.p.	-	Intraperitoneal
i.t.	-	Intratecal
i.v.	-	Intravenoso
LPNC	-	Ligação parcial do nervo ciático
MPO	-	Mieloperoxidase
NPIQ	-	Neuropatia periférica induzida por quimioterápico
NPIP	-	Neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel
PI3K	-	Fosfatidilinositol 3 quinase
PI3Kγ	-	Fosfatidilinositol 3 quinase gama

PKC	-	Proteína quinase C
PLC	-	Fosfolipase C
PTX	-	Paclitaxel
SNC	-	Sistema Nervoso Central
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral alfa
TRP	-	Receptor de potencial transitório
v.o.	-	Via oral

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	21
DOR NEUROPÁTICA	25
QUIMIOCINAS	28
PARTICIPAÇÃO DE QUIMIOCINAS EM MODELOS	
EXPERIMENTAIS DE DOR	30
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR CRÔNICA	32
2 – OBJETIVOS.....	39
OBJETIVO GERAL	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 - ANIMAIS	41
3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	41
3.2.1 – INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	41
3.2.2 – LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO	42
3.2.3 – NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	42
3.2.4 – EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS	43
3.2.5 – VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS	44
3.2.6 – DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	44
3.2.7 – ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	45
3.2.8 – DOSAGEM DE CITOCINAS.....	45
3.2.9 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	46
3.3 - PROTOCOLOS DE TRATAMENTOS	48
3.3.1 – CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1.....	48
3.3.2 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA INDUZIDA APÓS LPNC	48
3.3.3 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC.....	49
3.3.4 – INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA GÊNESE DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELO PTX	49

3.3.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX	49
3.3.6 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL COM SB225002 OU COM O ANTICORPO ANTI-CXCL1 SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX	50
3.3.7 – ENVOLVIMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR CXCR2 NA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX	50
3.4 - SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	51
3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4 – RESULTADOS.....	53
4.1 – INJEÇÃO INTRANEURAL DA QUIMIOCINA CXCL1 EM CAMUNDONGOS.....	53
4.1.1 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DA QUIMIOCINA CXCL1 SOBRE A SENSIBILIDADE MECÂNICA E TÉRMICA	53
4.1.2 – EFEITO DO TRATAMENTO COM GABAPENTINA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	55
4.1.3 – EFEITO DO TRATAMENTO COM SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	57
4.1.4 – AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	58
4.1.5 – AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	61
4.1.6 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE PRODUTOS DE CICLOOXIGENASES E DA LIBERAÇÃO DE CATECOLAMINAS NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1	62
4.2 – ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELA LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO	65

4.2.1 – QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA A QUIMIOCINA CXCL1 APÓS A LPNC EM CAMUNDONGOS	65
4.2.2 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CXCL1 NO NERVO CIÁTICO E NA MEDULA ESPINHAL APÓS LPNC EM CAMUNDONGOS	67
4.2.3 – AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO MODELO ANIMAL DE LPNC	69
4.2.4 – EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA LPNC	71
4.2.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA GÊNESE DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC	72
4.2.6 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC	76
4.2.7 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL COM O ANTICORPO ANTI- CXCL1 SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC	78
4.2.8 – AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA LIBERAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS APÓS A LPNC	80
4.3 – ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	82
4.3.1 – QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA A QUIMIOCINA CXCL1 APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL	82
4.3.2 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CXCL1 NO NERVO CIÁTICO E NA MEDULA ESPINHAL APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL	84
4.3.3 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 E DO SEU RECEPTOR NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	86
4.3.4 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM ANTICORPO ANTI-CXCL1 E SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	88
4.3.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 E DO SEU RECEPTOR NOS MECANISMOS CENTRAIS	

DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	90
4.3.6 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL PREVENTIVO COM ANTICORPO ANTI-CXCL1 E SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL	92
4.3.7 – ENVOLVIMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DO RECEPTOR CXCR2 NA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX	94
5 – DISCUSSÃO.....	99
6 – SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

1 – INTRODUÇÃO

A dor é um importante mecanismo fisiológico de defesa contra agentes nocivos externos ou lesão tecidual, caracterizada por uma experiência sensorial e emocional desagradável. Esta modalidade sensorial é fruto da ativação de neurônios sensoriais especializados, denominados nociceptores, e de mecanismos que envolvem vias neuronais ascendentes e descendentes. Além disso, a dor tem um caráter subjetivo e por esse motivo pode ser modulada por diversos fatores comportamentais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (JULIUS e BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009; GOLD e GEBHART, 2010).

Considerando-se a natureza subjetiva da dor, é importante conceituar os termos dor e nocicepção. Nocicepção refere-se somente aos processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos. Enquanto a dor envolve áreas corticais com ativação dos componentes discriminativo, afetivo-motivacional, cognitivo e locomotor (RIEDEL e NEECK, 2001). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial” (IASP, 2012). É importante mencionar que a sensação dolorosa é comumente acompanhada de alterações sensoriais descritas na literatura como hiperalgesia (sensibilidade aumentada a um estímulo doloroso), alodinia (percepção de estímulo inócuo como sendo doloroso) e hiperestesia (sensibilidade aumentada dos neurônios sensoriais a estímulos sensitivos) (LOESER E TREEDE, 2008).

A transmissão da dor envolve a integração de mecanismos de detecção do estímulo nocivo periférico e sua condução até regiões do sistema nervoso central (SNC) que irão determinar a resposta de defesa. Primeiramente, esta transmissão engloba a detecção de estímulos nocivos pelo sistema nervoso sensorial periférico por receptores presentes nas terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias, como descrito previamente (LOESER e MELZACK, 1999). De uma maneira geral, estímulos tais como calor, frio, compressão, distensão, traumas, e algumas substâncias químicas são interpretados como nocivos quando direta ou indiretamente, ativam os nociceptores (BASBAUM et al., 2009). No entanto, o processamento do sinal doloroso pelo sistema nervoso central está sujeito a influência do componente emocional- afetivo do indivíduo (RUSSO e BROSE, 1998;

JULIUS e BASBAUM, 2001). A relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da intensidade do sinal doloroso envolve um complexo processamento através das vias sensoriais e, a natureza altamente subjetiva da codificação deste sinal dificulta sua compreensão e seu tratamento clínico (BASBAUM e JESSEL, 2000).

Como já mencionado, a sensação dolorosa é o resultado da ativação periférica de estruturas especializadas, as quais estão associadas às fibras aferentes primárias. Este sistema sensorial especializado está amplamente distribuído no organismo e transmite as informações nociceptivas da periferia para a medula espinhal, através da liberação de neurotransmissores. Existem duas principais classes de nociceptores, uma composta por neurônios finamente mielinizados, as fibras do tipo A δ , e outra formada por neurônios não mielinizados, as fibras do tipo C (MILLAN, 1999). A estimulação de fibras A δ promove resposta rápida que resulta na dor aguda, ou dor de primeira fase, que frequentemente desencadeia o reflexo de retirada. Essas se diferem substancialmente das fibras mielinizadas de grande diâmetro, A α e A β , que têm velocidade de condução rápida e são responsáveis pela informação proprioceptiva. Já as fibras do tipo C, são formadas por neurônios de corpos celulares de pequeno e médio diâmetro, são amielinizadas e apresentam velocidade de condução lenta. A ativação de fibras C leva a uma resposta duradoura, responsável por dor difusa, geralmente secundária à dor aguda e são considerados nociceptores polimodais por responderem a várias formas de estímulos nocivos (térmico, mecânico e químico) (para revisão, ver JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004).

Os corpos celulares das fibras aferentes primárias estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) (nervos espinhais) ou nos gânglios trigeminais (GT) (nervos cranianos), e conectam-se com neurônios do corno dorsal da medula espinhal e do núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (BESSON, 1999). Estes neurônios são denominados pseudo-unipolares, pois além do ramo periférico possuem um ramo central que adentra a medula espinhal. Essa característica permite que as proteínas sintetizadas nos gânglios (GRD e GT) sejam expressas tanto na periferia como nos terminais sinápticos centrais e facilita a comunicação entre ambos os terminais (para revisão ver HUNT E MANTYH, 2001).

Nestas regiões, os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios de segunda ordem (neurônios de projeção). O corno dorsal da medula espinhal é anatômico e eletrofisiologicamente

dividido em lâminas ou camadas. Os neurônios denominados nociceptivos encontram-se especialmente nas lâminas I, II e V da medula espinhal. As fibras A δ têm suas projeções nas lâminas I e V do corno da raiz dorsal, enquanto que as fibras C encontram-se mais superficialmente, nas lâminas I e II (para revisão ver BASBAUM et al., 2009). Vale ressaltar que essas conexões estão, no entanto, sujeitas as ações tanto de interneurônios inibitórios, como de interneurônios excitatórios, que podem inibir ou facilitar tais sinapses, causando, respectivamente, a inibição ou a exacerbação do impulso nociceptivo (MILLAN, 1999; YASAKA et al., 2010).

Uma vez estimulados, os neurônios de segunda ordem irão ativar, conforme a sua localização no corno dorsal da medula espinhal, vias paralelas que irão distribuir informações para circuitos supraespinhais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetiva/motivacionais (descontentamento) da dor (HUNT e MANTYH, 2001; PRICE, 2002). A informação nociceptiva vinda da medula espinhal pode ser enviada tanto para núcleos do tálamo, como para o tronco encefálico que integram os tratos espinho-talâmico e espinho-reticulo-talâmicos, respectivamente. A via espinho-talâmica clássica origina-se na lâmina II da medula espinhal e se estende até o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem enviam terminações ao córtex somatosensorial, onde ocorre a discriminação do estímulo. Já os aspectos emocionais e aversivos da dor são associados à ativação do córtex insular, giro cingulado anterior e amígdala (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004; BASBAUM et al., 2009; TODD, 2010). O processamento supra-espinhal da dor produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa, as quais são cruciais para a manutenção da vida do organismo (CRAIG, 2003).

O tipo mais comum de dor é referido como dor nociceptiva ou dor aguda. A dor aguda de maneira geral tem causa bem definida e o curso temporal é delimitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. Entretanto, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter o quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos o que compromete a qualidade de vida do indivíduo (LOESER, 2003; SKΦTT, 2003; COSTIGAN et al., 2009; FARRAR, 2010). De modo relevante, a dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente

associada com alterações adaptativas em vários níveis do sistema nervoso.

A dor crônica é um crescente problema de saúde e acredita-se que 30% dos adultos em todo o mundo são afetados por essa doença. Quando não tratada de forma adequada, a dor crônica pode ter consequências nefastas, sendo frequentemente associadas a quadros de depressão, isolamento social e afastamento do trabalho. A dor neuropática é especialmente problemática, pois geralmente apresenta resistência aos fármacos analgésicos tradicionais, sendo refratária até mesmo à analgesia da morfina (JOHANNES et al., 2010).

A dor crônica tem etiologia diversa. Ela compreende diferentes tipos de dor, incluindo a dor inflamatória (como artrite reumatóide), dor do câncer, e a dor neuropática (como as causadas por trauma ou diabetes) (STEIN et al., 1988; HONORE et al., 2000; COSTIGAN et al., 2009). A dor crônica é tipicamente caracterizada pela hiperalgesia, ou seja, o aumento da resposta a estímulos mecânicos e térmicos nocivos, bem como pela alodinia (o aumento da resposta a estímulos inócuos), uma vez que ocorrem mudanças significativas nas propriedades eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios nociceptores e da medula espinhal (LOESER e TREEDE, 2008). Além dos eventos periféricos, outra característica relacionada à dor crônica é o fenômeno de sensibilização central, ou seja, uma série de eventos (como mudanças no potencial de membrana celular, aumento na liberação de neurotransmissores, como o glutamato, e a facilitação da transmissão excitatória) que acabam por alterar a neurobiologia da dor (WOOLF, 2011).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (STEIN et al., 2003; JI et al., 2014). Já está bem estabelecido que na vigência de um processo inflamatório, mediadores químicos liberados localmente devido à lesão tecidual ou a ativação do sistema imune podem estimular e causar sensibilização de nociceptores localizados em neurônios aferentes primários de tecidos periféricos (MILLAN et al., 1999; BASBAUM et al., 2009). Dentre os principais mediadores inflamatórios liberados localmente estão mediadores clássicos (como prostaglandinas, H^+ , ATP, fatores de crescimento de nervo), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como microRNAs. A hiperatividade de fibras aferentes primárias após inflamação periférica também aumenta a liberação de neurotransmissores (como o glutamato), e

neuromoduladores (como a substância P, CGRP, BDNF) nas terminações nervosas na medula espinhal e no núcleo trigeminal, causando a hiperatividade de neurônios pós-sinápticos, responsáveis assim pela sensibilização central (WOOLF e SALTER, 2000). Ainda, estudos recentes indicam que a neuroinflamação (periférica e central) seria a responsável por gerar e sustentar a sensibilização de neurônios nociceptivos, o que leva o desenvolvimento de dor crônica, principalmente no que diz respeito a dor neuropática (para revisão ver JI et al., 2014).

DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática faz parte do quadro de processos dolorosos crônicos (JENSEN e BARON, 2003), como mencionado anteriormente, e estima-se que 1 % da população mundial sofra desta condição dolorosa (NICHOLSON, 2000). Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 4 milhões de pessoas apresentam algum tipo de neuropatia (NATIONAL PAIN FOUNDATION, 2009). A taxa de incidência anual de dor neuropática no Reino Unido é de 80 a cada 100.000 pessoas (HALL et al., 2006).

Segundo o Comitê de Taxonomia da IASP, a dor neuropática é definida como “dor originada em consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial” (LOESER e TREEDE, 2008). As neuropatias que causam dor em humanos podem resultar de lesão nervosa, uso crônico de determinados medicamentos (vincristina, cisplatina e paclitaxel - PTX) ou ainda podem estar associadas a algumas doenças (câncer, herpes, SIDA) ou transtornos metabólicos (diabetes) (WOOLF e MANNION, 1999; DWORKIN et al., 2003; JI e STRICHARTZ, 2004; KEHLET et al., 2006). Quanto a sua duração, a dor neuropática pode persistir até mesmo após o desaparecimento do dano tecidual inicial, estendendo-se por meses ou anos e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo. Estas síndromes podem apresentar uma combinação de sintomas, que incluem sintomas negativos (prejuízos sensoriais), como perda completa ou parcial da sensibilidade, bem como parestesia (sensação cutânea de formigamento, cócegas, picada), disestesia (sensação desagradável anormal ao toque) e dor (BACKONJA e STACEY, 2004). A sensação permanente de dor em queimação é relatada, e parece decorrer da atividade espontânea das fibras C nociceptivas, as quais também promovem sensibilização dos neurônios do corno dorsal na medula espinhal. Da mesma maneira, a

atividade espontânea de fibras A está relacionada à parestesia e, após sensibilização do SNC, à disestesia e à dor (WOOLF e MANNION, 1999; JI et al., 2014).

Ainda, na prática clínica tem sido extensivamente descrito que a dor neuropática é de difícil tratamento, pois a maior parte das terapias clássicas utilizadas para o tratamento da dor não costumam funcionar neste tipo de doença (COSTIGAN et al., 2009). Opções terapêuticas para o tratamento desta condição têm aumentado nos últimos anos, embora a maioria delas não produza resultados satisfatórios, além de causarem sérios efeitos adversos. Dentre as opções disponíveis estão os antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésicos locais, analgésicos opióides e não opióides, drogas antiinflamatórias e antiarrítmicos (VADALOUCA et al., 2006).

De uma maneira geral, cerca de 70% dos pacientes que sofrem de dor crônica apresentam melhora do quadro com monoterapia tradicional. Outros 15% a 20% respondem satisfatoriamente a terapias combinadas. Isto significa que 10% a 15% dos pacientes são refratários a todas as formas de farmacoterapia clinicamente disponíveis (ILSE, 2002). Neste sentido, a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos na neurotransmissão deste tipo de dor tem como foco principal a identificação de novos alvos moleculares destinados ao desenvolvimento de medicamentos analgésicos para o tratamento de condições de dor crônica que não respondem à farmacoterapia atual.

Tanto mecanismos periféricos quanto centrais podem gerar e modular a dor neuropática (GAO e JI, 2010). Os mecanismos periféricos que ocorrem após uma lesão de nervo periférico têm sido extensivamente estudados, porém ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos. No momento em que o nervo periférico é lesionado, alguns componentes da resposta inflamatória como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, histamina, serotonina, e bradicinina são liberados a partir da fibra nervosa lesionada e células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos) que migram para o sítio de lesão, em resposta à degeneração dos axônios ou células de Schwann (JI e STRICHARTZ, 2004; SOMMER e KRESS, 2004; ABBADIE, 2005). Estes mediadores depois de liberados podem ativar diretamente as fibras sensoriais periféricas, resultando no aumento da responsividade a estímulos mecânicos e térmicos dos neurônios sensoriais primários (SCHAFERS et al., 2003; SOMMER e KRESS, 2004; SCHOLZ e WOOLF, 2007; KAWASAKI et al., 2008). Além disso, esta cascata de eventos causa o aumento da expressão e/ou atividade de canais iônicos

nos neurônios nociceptivos, como os canais de sódio, cálcio e de potencial transitório (TRP), resultando em hiperexcitabilidade neuronal (SCHOLZ e WOOLF, 2007; REN e DUBNER, 2010). Na porção proximal à lesão forma-se um neuroma, que produz descargas ectópicas que chegam ao SNC e são interpretadas como originadas do membro lesionado (MACFARLANE et al., 1997). As descargas ectópicas periféricas provocam reorganização e alterações nas fibras sensoriais que chegam ao corno dorsal e, como consequência, a dor passa progressivamente a ser controlada por vias centrais, resultando na sua amplificação e persistência (KUNER, 2010; WOOLF, 2011).

Já a sensibilização central está relacionada, entre outros fatores, com aumento da liberação de neuromoduladores (descritos previamente), de receptores glutamatérgicos (NMDA e AMPA) que medeiam a transmissão sináptica excitatória em neurônios do corno dorsal, além, da queda do controle inibitório da dor, através da diminuição dos receptores ácido γ -aminobutírico (GABA) e por perda de interneurônios inibitórios decorrentes da excitotoxicidade (WOOLF e MANNION, 1999; COULL et al., 2005).

Evidências atuais demonstram que células não-neuronais como células do sistema imune (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) e células da glia do sistema nervoso periférico (células de Schwann e células satélites) e central (astrócitos e microglia) também participam de maneira crucial no processamento da dor neuropática (HANANI et al., 2002; STREIT, 2002; MARCHAND et al., 2005; SCHOLZ e WOOLF, 2007; MCMAHON e MALCANGIO, 2009; MILLIGAN e WATKINS, 2009). De uma maneira geral, na periferia, as vias de sinalização entre neurônios sensoriais primários, células de Schwann e células do sistema imunológico estão intimamente relacionadas, e vem sendo demonstrado que as citocinas e algumas quimiocinas são componentes centrais nesta complexa rede (para revisão ver JI et al., 2014). Ainda, astrócitos e microglias também têm papéis bem documentados na facilitação da transmissão do estímulo doloroso a nível medular, através da liberação de potentes neuromoduladores, como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento (TSUDA et al., 2005; ABBADIE et al., 2009; MILLIGAN e WATKINS, 2009). Enquanto a participação periférica de citocinas pró-inflamatórias (fator de crescimento tumoral, TNF- α ; interleucina 1 β , IL-1 β ; interleucina 6, IL-6) na dor neuropática já está bem estabelecida (ARRUDA et al., 1998; MILLIGAN et al., 2003; LEE et al., 2004; OHTORI et al., 2004; LEDEBOER et al., 2005), e os mecanismos de sensibilização central destas citocinas

também foram demonstrados (GUO et al., 2007; KAWASAKI et al., 2008), existem poucos estudos disponíveis acerca do papel das quimiocinas na modulação da dor neuropática.

Até o momento, não foram desenvolvidas terapias eficazes para o tratamento da dor crônica. Além disso, as opções disponíveis atualmente para o tratamento deste tipo de dor são acompanhadas de muitos efeitos adversos que limitam o uso destes medicamentos. Portanto, é importante que sejam realizados estudos para identificar alvos moleculares que sirvam como ponto de partida para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da dor neuropática. Assim, serão discutidas na seção seguinte as quimiocinas, em especial a quimiocina CXCL1, conhecida também como quimiocina derivada de queratinócitos (KC), e seu potencial como alvo no alívio desta condição patológica.

QUIMIOCINAS

As quimiocinas são uma família de pequenos polipeptídeos que pertencem a um grupo particular de citocinas (citocinas quimiotáticas) com propriedades químicas e funcionais específicas (BAGGIOLINI et al., 1997; ASENSIO E CAMPBELL, 1999; KIM, 2004). Como as citocinas, as quimiocinas são secretadas por leucócitos, células residentes, entre outras, tanto de maneira constitutiva, como induzida. Estes peptídeos estão envolvidos em uma série de processos biológicos e patológicos, agindo principalmente no controle da migração de leucócitos (CHARO E RANSOHOFF, 2006; SAVARIN-VUAILLAT e RANSHOFF, 2008).

Esta família de polipeptídeos é composta por aproximadamente 50 moléculas em humanos, com homólogos em outras espécies de mamíferos (CHARO e RANSOHOFF, 2006). Estruturalmente, as quimiocinas são peptídeos com peso molecular entre 8 e 14 kD, contendo cerca de 70 a 130 aminoácidos e, apresentam resíduos de cisteína conservados em quase todos os grupos (BAGGIOLINI, 2001; SAVARIN-VUAILLAT e RANSHOFF, 2008). As quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias de acordo com a posição e números dos resíduos de cisteína: CC, CXC, XC e CX3C (LUSTER, 1998). São estes resíduos que formam pontes dissulfeto, responsáveis pela conformação tridimensional das quimiocinas (BAGGIOLINI, 2001).

A subfamília CC é o grupo com o maior número de membros, formado por 28 quimiocinas, que têm diversas atividades biológicas, entre elas o recrutamento de monócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, e células dendríticas. As quimiocinas CXC são o segundo maior grupo, e são divididas novamente segundo a presença da sequência de três aminoácidos (glutamato-leucina-arginina; ELR) localizados próximo ao N-terminal. As quimiocinas ELR-CXC recrutam preferencialmente neutrófilos, enquanto as quimiocinas não ELR-CXC são mais específicas para linfócitos. Já as quimiocinas XC são seletivas para linfócitos, e a representante do grupo CX3C (CX3CL1 ou fractalcina) atua sobre linfócitos T e células natural killer (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000).

Em relação à nomenclatura das quimiocinas, um grande problema foi enfrentado após o ritmo acelerado de descoberta destes peptídeos, pois diferentes grupos de pesquisadores relatavam a mesma molécula com nomes diferentes. Para abordar esta questão, um novo sistema de classificação foi apresentado no Chemokine Keystone Symposium do ano de 1999, pelo Comitê da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000). A nova nomenclatura das quimiocinas proposta foi baseada na nomenclatura dos receptores de quimiocinas utilizada, que é definida pela subclasse específica de cada receptor (CC, CXC, XC, ou CX3C) seguido por R (de receptor) e depois um número (MURPHY et al, 2000). Basicamente, a nova nomenclatura para quimiocinas proposta substitui o R pelo L para designar os ligantes, seguido de um número. O sistema de numeração utilizado está relacionado aos que codificam cada quimiocina. Desta maneira, através da utilização da nova nomenclatura pode-se eliminar ambiguidades, além de indicar diretamente a classe a que pertence cada quimiocina (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000).

Em relação aos receptores para as quimiocinas, a grande maioria destes age sobre proteínas G do tipo inibitórias (Gi) ativando mecanismos de sinalização intracelular como as fosfolipases (A2, β 2 e β 3, D) e proteínas quinases (IP3 quinase, proteína quinase C e tirosina quinase). Isso resulta no acúmulo de mediadores lipídicos como o IP3, bem como no influxo de cálcio e também na ativação de pequenas GTPases, que coordenam os processos de adesão celular, polimerização da actina, eventos contráteis e de polarização celular, permitindo o movimento celular (CURNOCK et al., 2002). De maneira geral, um único receptor pode reconhecer e ser ativado por diferentes quimiocinas dentro de uma mesma subfamília, caracterizando uma superposição de

seletividade (GERARD e ROLLINS, 2001; LE et al., 2004). O padrão da expressão celular dos receptores determina quais os tipos de células que respondem a determinadas quimiocinas. Os receptores de quimiocinas podem ser regulados negativamente pela exposição contínua a quimiocinas, o que causa dessensibilização. Este parece ser o provável mecanismo de finalização das respostas iniciadas por fatores quimiotáticos (GERARD E ROLLINS, 2001).

PARTICIPAÇÃO DE QUIMIOCINAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR

Como descrito previamente, o principal papel das quimiocinas no desenvolvimento de um processo inflamatório é o recrutamento de células do sistema imune para o sítio de inflamação. Entretanto, outras funções vêm sendo atribuídas para estes peptídeos como a angiogênese, modulação da resposta imune e febre (BAGGIOLINI, 2001; JIN et al., 2008). Ainda, dados atuais da literatura indicam que, assim como as citocinas, as quimiocinas desempenham papel crucial para o desenvolvimento da dor inflamatória (para revisão ver VERRI et al., 2006). As primeiras evidências confirmando a participação direta de uma quimiocina na dor foi através da administração intradérmica da mesma em ratos, sendo observada a diminuição do limiar de dor. Cunha e colaboradores (1991) demonstraram que a administração intraplantar de interleucina-8 (IL-8) na pata de ratos causou hiperalgesia mecânica de maneira dose e tempo dependente.

A IL-8 pertence à subfamília CXC, e tem como representantes a quimiocina CINC-1 em ratos e CXCL1 em camundongos, uma vez que ratos e camundongos não a produzem, e estas apresentam acentuada homologia da sequência de aminoácidos entre si (BOZIC et al., 1994). De uma maneira geral, esta quimiocina é liberada por macrófagos ativados e células endoteliais, entre outras células, e causam preferencialmente o recrutamento de neutrófilos através da ligação de seus receptores específicos, CXCR1 e CXCR2 (AHUJA e MURPHY, 1996; para revisão ver REUTERSHAN, 2006).

Além disso, estudos recentes demonstram o envolvimento da quimiocina pró-inflamatória CXCL1 em uma série de doenças inflamatórias associadas à dor, tais como colite e artrite (BENTO et al., 2008; SHEA-DONOHUE et al., 2008, NANJUNDAIAH et al., 2013). Estas evidências sugerem o papel da quimiocina CXCL1 e seu receptor CXCR2 em modelos experimentais de dor. De fato, foi estabelecido em

um estudo anterior que a quimiocina CXCL1 juntamente com outras citoninas pró-inflamatórias (tais como a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6) é uma das primeiras citocinas a participar no desenvolvimento de dor inflamatória em camundongos. Cunha e colaboradores (2005) verificaram que a injeção intraplantar de carragenina induz a liberação da quimiocina CXCL1 no tecido epitelial da pata de camundongos, e que o tratamento dos animais com anticorpo anti-CXCL1 inibe parcialmente a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. Confirmando esse resultado, foi demonstrado que a administração intraplantar de CXCL1 induz hiperalgesia mecânica de maneira dose e tempo dependentes em camundongos (CUNHA et al., 2005). Ainda, foi demonstrado previamente que o tratamento com o antagonista alostérico não-competitivo dos receptores CXCR1/2, DF 2162, inibiu a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, lipopolissacarídeo e zymosan em camundongos (CUNHA et al., 2008). Além disso, um trabalho recente do nosso grupo comprovou o efeito antinociceptivo do SB225002, um antagonista seletivo do receptor CXCR2, em diferentes modelos comportamentais de dor aguda e persistente (MANJAVACHI et al., 2010a). Neste mesmo estudo foi demonstrado que o tratamento sistêmico com o antagonista SB225002 preveniu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de ligação parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos, sugerindo assim a participação da quimiocina CXCL1 e de seu receptor nos mecanismos periféricos da dor neuropática.

Apesar do papel bem estabelecido da quimiocina CXCL1 e do seu receptor CXCR2 em modelos experimentais de dor inflamatória, o seu papel na dor neuropática foi pouco explorado. Contudo, diversos estudos anteriores demonstraram que as quimiocinas desempenham papel crucial na patogênese das doenças inflamatórias clássicas e também no desenvolvimento e/ou manutenção da dor neuropática. Ademais, já está bem estabelecido que as quimiocinas liberadas periféricamente são reguladas por várias células após a lesão do nervo periférico, e que recrutam leucócitos circulantes nos nervos lesionados, provocando sensibilização periférica (para revisão ver KIGUCHI et al., 2012). Vale ressaltar que a expressão, distribuição e a função periférica ou central de quimiocinas e seus receptores têm sido investigadas, porém, apenas a participação de duas quimiocinas, CCL2 e CX3CL1, e seus receptores está bem definida.

Tanaka e colaboradores (2004) demonstraram que ocorre o aumento da expressão da quimiocina CCL2 em neurônios sensoriais

lesionados em um modelo de dor neuropática em que a administração intratecal desta quimiocina induz hiperalgesia mecânica. De fato, animais com deleção gênica para o receptor CCR2 apresentam hipersensibilidade mecânica reduzida após ligação parcial do nervo ciático (ZHANG et al., 2007). Ainda, a ativação e o recrutamento de macrófagos para o sítio de lesão em um modelo de dor neuropática são mediados pela quimiocina CCL2 através da ligação com seus receptores CCR2, CCR1 e CCR5, respectivamente (PERRIN et al., 2005). Alguns estudos demonstram aumento na imunoreatividade da quimiocina CX3CL1 e seu receptor CX3CR1 no gânglio da raiz dorsal (DRG) e medula espinhal após a indução da dor neuropática em roedores (MILLIGAN et al., 2004; VERGE et al., 2004). Além do possível papel periférico destas duas quimiocinas no desenvolvimento da dor neuropática, diversos estudos têm sugerido a participação da CCL2 e CX3CL1 no recrutamento e na ativação de células da glia para o corno dorsal da medula espinhal após a lesão nervosa periférica (ABBADIE et al., 2003; LINDIA et al., 2005; ZHANG et al., 2006; ZHUANG et al., 2007; THACKER et al., 2009).

Considerando as evidências a cerca da participação das quimiocinas em modelos experimentais de dor crônica, no presente trabalho nos propusemos a estudar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 na indução e na manutenção da hiperalgesia causada por diferentes modelos animais de dor crônica. Portando, abaixo serão apresentadas as principais características de alguns modelos experimentais de dor crônica importantes para o estudo de parte dos mecanismos fisiopatológicos associados à dor crônica.

MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR CRÔNICA

Nos últimos 30 anos vários modelos animais foram desenvolvidos para o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na dor crônica. Os modelos animais disponíveis mimetizam com certa variabilidade alguns dos principais sintomas observados clinicamente (HANSSON e DICKENSON, 2005; MOGIL, 2009). Estes modelos, apesar de suas limitações, têm contribuído de forma importante para o entendimento de alguns dos mecanismos implicados na produção e na manutenção da dor crônica, além de serem úteis para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (MCMAHON e PRIESTLEY, 1995; SELTZER, 1995; PITCHER et al., 1999;

ZIMMERMANN, 2001; SMITH et al., 2002; WANG e WANG, 2003; MOGIL et al., 2010).

As medidas indiretas e comportamentos nociceptivos são usados para aferir a sensibilidade dolorosa anormal em animais com dor crônica, tais como alterações do comportamento exploratório, autolimpeza, interação social, preferência de local, autotomia (morder diretamente o tecido desnervado), flexão espontânea do membro lesado ou mudanças no comportamento geral, associadas à avaliação de parâmetros fisiológicos como atividade espontânea da fibra aferente primária (DUBNER; REN, 1999; KAUPPILA, 1998; MILLS et al., 2001).

Dentre alguns dos modelos animais de dor crônica propostos na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela instalação e manutenção do quadro de hiperalgesia crônica estão:

Injeção intraneural de mediadores inflamatórios

Como descrito anteriormente, já está bem estabelecido na literatura que após uma lesão nervosa a inflamação periférica tem participação crucial no estabelecimento da dor neuropática. Alguns pesquisadores defendem a ideia de que mediadores inflamatórios liberados no local da lesão são os responsáveis pela atração endoneural de células imunes e amplificação do processo de inflamação intraneural. Ainda, a liberação de citocinas pró-inflamatórias intraneuralmente parece ser um importante componente na geração de impulsos ectópicos em fibras aferentes primárias lesionadas, o que leva ao estabelecimento da dor neuropática (para revisão ver JÄNIG e LEVINE, 2013). No entanto, os mecanismos subjacentes pelos quais as citocinas contribuem para a geração de impulsos ectópicos ainda é uma importante área a ser investigada.

Neste sentido, foi desenvolvido o modelo animal de injeção intraneural de citocinas no nervo ciático de roedores na tentativa de elucidar a contribuição da liberação destes mediadores inflamatórios no desenvolvimento da dor neuropática. O primeiro modelo descrito na literatura foi proposto por Wagner e Myers (1996), cujo objetivo foi determinar se a injeção intraneural TNF- α poderia reproduzir os comportamentos nociceptivos encontrados em outros modelos experimentais após lesão nervosa. Os dados deste trabalho demonstraram que a injeção de TNF- α no nervo ciático de ratos induziu comportamentos de dor, bem como mudanças morfológicas e fisiológicas das fibras nervosas, semelhantes aos encontrados nos

modelos animais de lesão nervosa. Outros mediadores inflamatórios também foram utilizadas no modelo de injeção intraneural, tais como a IL-1 β (ZELENKA et al., 2005), IL-15 (GOMEZ-NICOLA et al., 2008), CX3CL1 (HOLMES et al., 2008) e IL-17 (KIM e MOALEM-TAYLOR, 2011), com o intuito de propor possíveis mecanismos pelos quais essas citocinas estão envolvidas na dor crônica.

Modelos de lesão nervosa

Diversos modelos animais de lesão nervosa traumática têm sido propostos na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela instalação e a manutenção do quadro neuropático. Estes modelos animais disponíveis mimetizam com certa variabilidade alguns dos principais sintomas observados clinicamente após a lesão nervosa. A transecção completa ou axotomia do nervo ciático foi o primeiro modelo animal proposto por Wall e colaboradores (1979), que apesar de fornecer informações importantes, possui algumas limitações quanto à coleta de dados na pata desnervada.

Como grande parte dos pacientes com dor neuropática apresenta apenas lesão parcial do nervo ciático, foi padronizado o modelo de lesão por constrição crônica, onde um fio de sutura é amarrado ao redor no nervo ciático (4 suturas frouxas com intervalos de 1-2 mm) e o comportamento pós-operatório dos roedores indicou que foram produzidas hiperalgesia, alodinia e dor espontânea (ou disestesias) neste modelo (BENNETT e XIE, 1988). Outro modelo bastante utilizado atualmente é a ligação parcial do nervo ciático, proposto por Seltzer e colaboradores (1990), já que evita complicações na interpretação dos comportamentos associados com a desnervação completa de nervos. Este modelo parece determinar o surgimento de alterações semelhantes aquelas observadas na clínica (modelo de trauma ou contusão acidental do nervo ciático), uma vez que apenas algumas horas após a lesão, e por vários meses seguintes, os animais desenvolveram comportamento de guarda e lambidas da pata posterior, o que sugere a possibilidade de dor espontânea. Outras vantagens do modelo de lesão parcial do nervo ciático é a possibilidade de avaliar a dor evocada, e também a ausência de autotomia apresentados nos modelos citados anteriormente. Porém, a intensidade da lesão é de difícil controle, resultando em graus variáveis de dano entre os animais (SELTZER et al., 1990).

Ainda, foram desenvolvidos os modelos de ligação dos nervos espinhais e lesão limitada do nervo. No modelo de constrição

dos nervos espinhais, proposto por Kim e Chung (1992), apenas as raízes L5 e L6 encontram-se comprometidas, enquanto o segmento L4 garante a inervação da pata. Já no modelo de lesão limitada do nervo, é causado pela ligação e ressecção de 2-4 mm dos nervos peroneal e tibial, com nervo sural intacto, e caracterizado pela ausência de autotomia, diminuição do peso sobre o membro afetado, bem como pela presença de alodinia tátil e ao frio, e hiperalgesia térmica (DECOSTERD e WOOLF, 2000).

Os modelos acima citados foram originalmente desenvolvidos em ratos. Porém, atualmente, já existem adaptações destes modelos para camundongos, tais como lesão parcial ou completa do nervo ciático, transecção de nervos espinhais e constrição espinhal lombar (MALMBERG e BASBAUM, 1998; MOGIL et al., 1999; SOMMER et al., 1999; 2001).

Outros modelos de dor neuropática

A neuropatia periférica é uma condição comum que pode estar associada a inúmeros fatores, entre eles algumas doenças (câncer, herpes, SIDA), transtornos metabólicos (diabetes), ou ainda o uso crônico de determinados medicamentos (vincristina, cisplatina e paclitaxel) (WOOLF e MANNION, 1999). Neste sentido, assim como os modelos animais de lesão nervosa traumática, também foram desenvolvidos alguns modelos animais que mimetizam os estados clínicos acima citados, em especial a diabetes e o uso crônico de quimioterápicos.

A neuropatia diabética induzida pela estreptozocina é um modelo animal proposto por Courteix e colaboradores (1993), o qual é amplamente utilizado até os dias de hoje por ser um importante modelo de dor neuropática associada a um estado clínico específico e ser facilmente induzido, sem necessidade de cirurgia. Neste trabalho foi demonstrado que ratos tratados com estreptozocina (75 mg/kg, i.p.), além dos sintomas clínicos clássicos da diabetes (diminuição da insulina circulante, hiperglicemia, poliúria e perda de peso), também apresentaram variação na sensibilidade à dor (COURTEIX et al., 1993). Porém, a causa da neuropatia neste modelo ainda não é bem compreendida, e as complicações do estado de saúde dos animais são graves, o que não o permite representar toda a complexidade envolvida na diabetes.

Em relação a neuropatia periférica induzida por quimioterápico (NPIQ), esta pode ocorrer de três formas: i) autonômica, ii) motora e/ou

iii) sensorial. Esta última, é a forma mais frequente entre os quimioterápicos, e pode manifestar-se como parestesia ou disestesia, dor em queimação, bem como alodinia mecânica e ao frio. A NPIQ do tipo sensorial dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento e, frequentemente, leva a ajustes (diminuição) na dose eficaz contra o câncer ou, até mesmo, interrupção da quimioterapia (QUASTHOFF e HARTUNG, 2002). Ainda, a dor causada pela quimioterapia é um fator adicional para a diminuição da qualidade de vida do paciente oncológico, o qual normalmente já é acometido pela dor causada pela própria doença (BALAYSSAC et al., 2011). Outro fator que reforça a importância clínica da NPIQ é o fato de que ela pode causar dor crônica, com duração de meses ou anos (HAN e SMITH, 2013). Desta maneira, o desenvolvimento de modelos animais na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela instalação da NPIQ são de extrema importância principalmente no que diz respeito a estratégias preventivas.

O primeiro modelo animal proposto por Aley e colaboradores (1996) para a indução de NPIQ foi através da administração de vincristina (100 µg/kg, i.v., durante 14 dias) em ratos. Outro modelo animal desenvolvido para a instalação da NPIQ foi a utilização do quimioterápico PTX (2 mg/kg, i.p., durante 4 dias) (POLOMANO et al., 2001). Ambos modelos compartilham algumas características como a indução de alodinia e hiperalgesia (mecânica e térmica) e a duração do quadro nociceptivo por até 35 dias após o tratamento com estes quimioterápicos (ALEY et al., 1996; POLOMANO et al, 2001). Além disso, alguns possíveis mecanismos são sugeridos como responsáveis pelo dano neuronal causado pela quimioterapia (JAGGI e SINGH, 2012). Em relação aos taxanos, acredita-se que o efeito tóxico destes medicamentos sobre os aferentes primários ocorra por atuarem sobre a dinâmica dos microtúbulos axonais, como na formação (vincristina) ou aumento da polimerização (PTX), o que impediria o funcionamento normal do citoesqueleto celular e, conseqüentemente, comprometeria o transporte axonal de proteínas, vesículas e organelas (CARLSON e OCEAN, 2011). Ainda, há fortes evidências acerca do envolvimento de disfunção mitocondrial, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio (excitotoxicidade neuronal) e estresse oxidativo. Tais eventos podem desencadear apoptose celular, a qual seria responsável pela degeneração de fibras sensoriais periféricas (FLATTERS e BENNETT, 2006; JAGGI e SINGH, 2012).

Outro mecanismo que parece estar envolvidos na neurotoxicidade causada pelos taxanos, os quais podem ser causa ou consequência dos eventos citados acima, é a produção de mediadores inflamatórios. Utilizando-se o modelo de neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina, Siau e colaboradores (2006) verificaram aumento no número de células de Langerhans na epiderme de roedores, as quais podem liberar mediadores como óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotróficos, os quais podem sensibilizar/ativar os neurônios sensoriais remanescentes. A produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos no GRD de roedores também foi reportada para o modelo do PTX (LEDEBOER et al., 2007). Ainda, estudos também sugerem o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios produzidos pela microglia na medula espinhal no modelo da neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina (JAGGI e SINGH, 2012).

Desta maneira, no presente estudo nos propusemos a utilizar alguns dos modelos animais de dor crônica acima descritos para avaliar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 no desenvolvimento e manutenção de sinais de dor crônica.

2 – OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível contribuição da quimiocina CXCL1 e de seu receptor CXCR2 no desenvolvimento e na manutenção dos sinais de dor crônica através da utilização de modelos animais, de técnicas de biologia molecular, de tratamentos farmacológicos e de observações comportamentais em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de camundongos aos estímulos mecânico e térmico após a injeção intraneural (i.n.) de CXCL1 no nervo ciático;
- Caracterizar farmacologicamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n. de CXCL1 no nervo ciático, bem como verificar a contribuição de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias para este modelo;
- Quantificar os níveis de CXCL1 e de seu RNAm nos modelos de lesão parcial do nervo ciático (LPNC) e de neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel (NPIP) em camundongos;
- Verificar o envolvimento da quimiocina CXCL1 na gênese e manutenção das respostas hiperalgésicas associadas ao modelo de LPNC e NPIP, através do tratamento local, sistêmico ou intratecal com o anticorpo anti-CXCL1;
- Avaliar a participação do receptor CXCR2 no desenvolvimento e na manutenção das respostas hiperalgésicas induzidas pela NPIP, através do tratamento sistêmico ou intratecal com o antagonista seletivo deste receptor (SB225002);

- Investigar a possível participação das principais vias de sinalização intracelulares envolvidas nas respostas do receptor CXCR2, através do tratamento intratecal com inibidores destas vias após a indução da NPPI.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (30- 40 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais utilizados foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60 - 80%) controladas em ciclo claro-escuro de 12 horas (luz entre 06h00min e 18h00min). Água e ração foram ofertadas *ad libitum*, exceto durante os procedimentos experimentais. Os procedimentos experimentais descritos abaixo foram conduzidos de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, 2013). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (número do protocolo PP00811).

Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos experimentais (6-8 animais por grupo) e todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de maneira cega a fim de reduzir viés experimental. Os animais permaneceram no laboratório a temperatura controlada (22 ± 2 °C) durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes comportamentais, realizados geralmente entre 08h00min e 16h00min. O número de animais e a intensidade dos estímulos nocivos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes.

3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 – INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

O primeiro bloco de experimentos do presente trabalho consistiu na avaliação do efeito da injeção intraneural (i.n.) de CXCL1 no nervo ciático de camundongos. Para isso, os animais foram anestesiados pela inalação de isoflurano (2% em 100% de oxigênio) e tiveram a região glútea direita depilada. O nervo ciático foi exposto após uma pequena incisão na região glútea, a musculatura entre o ilíaco e o músculo glúteo foi divulsionada, e 2 μ L de CXCL1 (1,25, 12,5 ou 125 fg/sítio) foram injetados no nervo ciático. Como grupo controle, um grupo de animais passou por todo o procedimento cirúrgico acima

descrito, porém foram injetados 2 μ L de veículo (tampão fosfato salino estéril contendo 0,1% de albumina) (ZELENKA et al., 2005). Três dias após a injeção, o desenvolvimento de comportamentos sugestivos de dor, hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, foi verificado através do teste de von Frey e da retirada da pata, respectivamente.

3.2.2 – LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO

O modelo de dor neuropática em animais foi produzido através da lesão parcial do nervo ciático (LPNC), de acordo com a metodologia descrita por Seltzer e colaboradores (1990), para ratos, e adaptada por Malmberg e Basbaum (1998), para camundongos. Os animais foram mantidos anestesiados através da inalação de isoflurano (2% em 100% de oxigênio) durante a cirurgia. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito lateral, a região glútea direita foi depilada e então foi realizada assepsia da pele com solução de polivinil pirrolidona-iodo (PVPI). Na sequência, foi feita uma pequena incisão na região glútea, a musculatura entre o músculo ilíaco e o glúteo foi divulsionada e o nervo ciático exposto. Utilizando uma agulha de fio cirúrgico 8-0, 1/3 a 1/2 do nervo foi perfurado e amarrado. Como grupo controle, um grupo de animais passou por todo o procedimento cirúrgico acima descrito, exceto pelo fato do nervo ciático direito, embora tenha sido exposto, não ter sido amarrado. Por esse motivo o grupo controle foi chamado de grupo falso-operado. Quatro dias após a indução da neuropatia, o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica ao calor foi verificado através do teste de von Frey e da retirada da pata, respectivamente.

3.2.3 – NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

A hiperalgesia causada por quimioterápico foi induzida pelo tratamento com paclitaxel (PTX), segundo metodologia proposta por Polomano e colaboradores (2001) e adaptada para camundongos (SMITH et al., 2004), com algumas modificações (COSTA et al., 2011). O quimioterápico foi administrado durante cinco dias consecutivos, entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. O PTX foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 2 mg/Kg, diariamente, 1 vez ao dia. Animais controle receberam o veículo (NaCl 0,9%). O volume de administração das soluções foi de 10 mL/Kg.

3.2.4 – EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Avaliação da hiperalgesia mecânica

Os animais (6-8 por grupo) foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente (9 x 7 x 11 cm) localizados sobre uma plataforma de arame elevada, para permitir o acesso a superfície ventral das patas traseiras direitas. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 1 h antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada das patas traseiras foi obtida através de 10 aplicações consecutivas (duração de 1 s cada) do filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). O filamento 0,6 g, por produzir em média 20% de frequência de retirada da pata, foi utilizado durante todo o trabalho por ser considerado um valor adequado para a avaliação da hiperalgesia mecânica (BORTOLANZA et al., 2002; QUINTÃO et al., 2005). Objetivando determinar o limiar mecânico basal (B), todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia e novamente avaliados em diferentes tempos após a injeção i.n de CXCL1, LPNC ou tratamento com PTX. O aumento de 2,5 vezes de porcentagem de retirada da pata (em relação ao basal de cada animal) foi considerado como indicativo de indução de hiperalgesia mecânica.

Avaliação da hiperalgesia térmica

A hiperalgesia ao calor foi avaliada através do método de “PawFlick” como descrito previamente (MENÉNDEZ et al., 2002). Um analgesímetro de calor radiante (*Tail-Flick* Analgesímetro, Albarsch, Porto Alegre, Brasil) foi utilizado para medir as latências de retirada da pata traseira direita dos camundongos (6-8 por grupo) frente à aplicação de um feixe de luz radiante (intensidade de 15). O limiar térmico basal (B) foi determinado em todos os grupos de animais e novamente avaliado em diferentes tempos após a injeção i.n de CXCL1 ou a LPNC. Com o intuito de evitar danos aos animais, o tempo máximo de exposição das patas ao feixe de luz foi de 20 s. A queda de 2,5 vezes do limiar térmico (em relação ao basal de cada animal) foi considerada como indicativo de indução de hiperalgesia térmica ao calor.

3.2.5 – VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

Administração local

A administração local foi realizada através da instilação das drogas sobre o nervo ciático imediatamente após a LPNC e antes da sutura dos tecidos adjacentes (SOMMER et al., 1998; LINDENLAUB et al., 2000).

Administração intratecal

A administração de drogas através da via intratecal (i.t.) foi realizada de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980), com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25 µL), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 µL de drogas ou veículo.

3.2.6 – DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Para avaliar o papel dos neutrófilos nos modelos de injeção i.n. de CXCL1 ou de LPNC, os camundongos foram depletados de neutrófilos, como descrito anteriormente (RAEBURN et al., 2002). Para isso, os animais receberam sistemicamente vimblastina (5 mg/Kg, i.v.) 24 e 72 h antes da injeção i.n. de CXCL1 ou da cirurgia de LPNC. A resposta de hiperalgesia mecânica foi medida em diferentes períodos de tempo após os procedimentos.

A fim de confirmar a depleção de neutrófilos induzida pelo tratamento com vimblastina (5 mg/Kg, i.v.) foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos em um grupo paralelo de animais. Para isso, amostras de sangue (1 mL) de animais devidamente anestesiados foram coletadas por punção cardíaca em microtubos contendo EDTA e processadas em um analisador hematológico automatizado para uso veterinário (Poch-100iV Diff® Sysmex) calibrado para camundongos. As coletas foram realizadas em diferentes grupos animais no 3º e 10º dia após o tratamento com vimblastina, e os valores de referência utilizados nas contagens foram descritos por Vianna (2007).

3.2.7 – ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

A migração de neutrófilos para diferentes tecidos foi quantificada indiretamente através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para isso, os animais foram sacrificados em diferentes tempos (1 - 96 h e 7 - 14 dias) após a injeção i.n. de CXCL1 ou LPNC, e o nervo ciático e segmentos lombares da medula espinhal (L4-L6) foram removidos. Os tecidos foram homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugados a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspensão em tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Foi adicionado, NaCl 0,2% gelado e após 30 segundos; NaCl 1,6% contendo glicose 5% (gelado). A solução foi centrifugada a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi outra vez ressuspensão em tampão 2 gelado (NaPO₄ 0,5 M e 5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); pH 5,4), e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C; e 25 µL do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO₄ 80 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm, e os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

3.2.8 – DOSAGEM DE CITOCINAS

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os níveis teciduais de CXCL1 (no nervo ciático ou segmentos lombares da medula espinhal (L4-L6)) e IL-1β (nervo ciático) foram determinados 1 a 96 h e 7 a 10 dias após a injeção i.n. de CXCL1 ou após a cirurgia de LPNC. Já após o tratamento com PTX, foram determinados apenas os níveis de CXCL1 (nervo ciático ou segmentos lombares da medula espinhal). Os respectivos tecidos foram removidos e homogeneizados com PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0.1 mM, cloreto de benzometônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/mL. O homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se Kits específicos para CXCL1 e IL1-β de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems). A dosagem de proteínas existentes nas

amostras foi realizada segundo o método de Bradford. Os resultados foram expressos por densidade ótica por miligrama de proteína.

Ensaio de citometria de fluxo (CBA)

Para a determinação dos níveis de TNF- α , IL-6 e CCL2 no nervo ciático após a administração i.n. de CXCL1 ou após a LPNC, um ensaio de esferas (CBA) foi utilizado. O preparo das amostras foi realizado como descrito anteriormente para a dosagem de citocinas. As amostras foram diluídas com tampão desnaturante 1/5 (v/v) e armazenadas a -70°C . Os níveis de TNF- α , IL-6 e CCL2 foram quantitativamente determinados através do uso de anticorpos do kit multiplex Flex Set Cytometric Bead Array (Becton Dickinson, RG, Brasil). Resumidamente, diluições seriadas dos padrões foram preparadas utilizando diluentes de ensaio. Subsequentemente, 50 μL de esferas de captura foram adicionados à curva padrão e as amostras. Após 3 h de incubação, 50 μL de reagente de detecção foram adicionados e as amostras foram incubadas por 1 h. As amostras foram então lavadas com tampão de lavagem, centrifugadas a 800 rpm durante 10 min e, em seguida, 150 μL de tampão de lavagem foram adicionados. A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando o Becton Dickinson FACS Canto II e a análise CBA através de software FCAP (Becton Dickinson). Um total de 900 eventos foi adquirido.

3.2.9 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Coleta de tecidos

Os diferentes grupos de animais (LPNC ou falso-operados, PTX ou veículo) foram sacrificados por decapitação 1, 3, 6 e 24 h após o procedimento cirúrgico para a coleta das seguintes amostras teciduais: nervo ciático, gânglios da raiz dorsal (GRD; seguimentos entre L₄ e L₆) e medula espinhal (L₄ e L₆). Após a coleta, as amostras foram congeladas (-70°C) até o dia da extração do RNA total.

Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos com 500 μL de reagente Trizol® (Invitrogen, SP, Brasil), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12000 g, durante 15 min a 4°C). Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados

500 µL de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida submetido à centrifugação (12000 g, 15 min, 4 °C), sendo que o precipitado formado foi ressuspensionado em 1 mL de etanol gelado. O RNA foi novamente centrifugado (7000 g, 5 min, 4 °C), o etanol desprezado e o precipitado dissolvido em água ultrapura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm. O RNA total foi estocado a -70 °C até o momento do uso.

Confecção do DNA complementar (cDNA)

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador para CXCL1 em diferentes tecidos após a LPNC e o tratamento com o PTX, foi realizado o ensaio da transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Para a reação da transcrição reversa amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µL de oligo dT, 1 µL do mix de dNTP (10 nM) em água ultrapura para um volume final de 12 µL. Inicialmente, as amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C, resfriadas por 5 min a 4 °C e acrescidas de 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, CXCL1375 mM e MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 mM e 1 µL de inibidor de RNAase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37 °C durante 2 min e a enzima M-MLV (1 µL, 200 U) foi adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C durante 50 min e a inativação da reação foi realizada através da incubação das amostras a 75 °C durante 15 min. O cDNA foi estocado a 4 °C até a realização da reação de RT-PCR.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O cDNA foi amplificado em triplicata utilizando o *kit* Master Mix TaqMan® Universal PCR, com sonda específica para camundongos, com marcação 3' *quencher* MGB-FAM para CXCL1 (Mm00433859_m1), e 3' *quencher* MGB-VIC para GAPDH (Mm03302249_g1), utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 µL de cDNA, 5 µL de master mix, 0,5 µL de primer e 3,5 µL de água ultrapura, em volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 60 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de

amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação relativa.

3.3 - PROTOCOLOS DE TRATAMENTOS

3.3.1 – CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

O envolvimento de diferentes mecanismos farmacológicos nos sinais de dor neuropática induzidos pela injeção i.n. de CXCL1 no nervo ciático foi avaliado através do tratamento com diferentes drogas. A gabapentina (70 mg/Kg, v.o.), medicamento utilizado clinicamente contra dores neuropáticas, foi administrada no 3º dia após a injeção i.n. de CXCL1, e as respostas hiperalgésicas foram avaliadas entre 1 e 6 horas após a administração da droga. Animais controle receberam somente o veículo (NaCl 0,9 %).

Além disso, outras drogas foram administradas sistemicamente durante 3 dias (2 vezes por dia), 30 minutos antes da injeção i.n. de CXCL1. As seguintes drogas foram utilizadas: antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002 (3 mg/Kg, i.p., diluída em Tween 80 1%, volume de 10 mL/Kg); inibidor não-seletivo de COX1/2, indometacina (5 mg/Kg, v.o., diluído em Na₂CO₃ 5%, volume de 10 mL/Kg); inibidor da liberação de catecolaminas, guanetidina (30 mg/Kg, s.c., diluída em salina, volume de 10 mL/Kg). Os animais controle receberam somente o veículo correspondente.

3.3.2 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA INDUZIDA APÓS LPNC

Neste experimento, animais da linhagem *Swiss* foram submetidos à LPNC. Os grupos experimentais receberam o anticorpo anti-CXCL1 localmente por instilação (100 ng/sítio) ou sistemicamente (10 µg/Kg, i.v.) no momento da cirurgia. Animais controle receberam o tratamento com anticorpo anti-IgG nas mesmas doses. A hiperalgesia

mecânica e térmica ao calor foi avaliada como descrito previamente a partir do quarto dia após a cirurgia.

3.3.3 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC

Camundongos da linhagem *Swiss* foram tratados com o anticorpo anti-CXCL1 (ou o anticorpo anti-IgG) sistemicamente (10 µg/Kg, i.v.) no quarto dia após a cirurgia de LPNC, período no qual os sinais de dor neuropática estão instalados. A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 0 e 48 horas após a administração dos anticorpos, enquanto a hiperalgesia térmica ao calor de 0 a 6 horas.

3.3.4 – INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA GÊNESE DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELO PTX

Com o intuito de avaliar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 na hiperalgesia causada pelo PTX, animais da linhagem *Swiss* foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Um grupo experimental recebeu o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, SB225002 (3 mg/Kg, i.p.), e outro grupo recebeu sistemicamente o anticorpo anti-CXCL1 (10 µg/Kg, i.v.). As drogas foram administradas uma vez ao dia até o 6º dia após o primeiro tratamento com PTX. A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 7 e 9 dias após o primeiro tratamento com PTX.

3.3.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX

Camundongos da linhagem *Swiss* foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) e, 7 dias após o primeiro tratamento, foram administrados com o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, SB225002 (3 mg/kg, i.p.) ou com o anticorpo anti-CXCL1 (10 µg/kg,

i.v.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 0 e 4 horas após a administração das drogas.

3.3.6 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL COM SB225002 OU COM O ANTICORPO ANTI-CXCL1 SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX

Neste experimento, os animais foram tratados com o quimioterápico (ou veículo) e, 7 dias após o primeiro tratamento, receberam por via i.t. o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, SB225002 (10 µg/sítio) ou o anticorpo anti-CXCL1 (1 ng/sítio). A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 4 horas após os tratamentos. Outros dois grupos experimentais foram tratados com SB225002 (10 µg/sítio) e anticorpo anti-CXCL1 (1 ng/sítio) pela via intratecal uma vez ao dia até o 6º dia após o primeiro tratamento com PTX. A hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 7 e 14 dias após o primeiro tratamento com PTX.

3.3.7 – ENVOLVIMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR CXCR2 NA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX

Os animais foram tratados com PTX (ou veículo) entre os dias 0 e 4 do protocolo experimental. Alguns grupos experimentais receberam os inibidores de fosfolipase C (PLC) (U73122 - 30 pmol/sítio, i.t.), proteína quinase C (PKC) (GF109203X - 1 nmol/sítio, i.t.), fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (Wortmaninn - 0,4 µg/sítio, i.t.) ou fosfatidilinositol 3 quinase gama (PI3Kγ) (AS650240 - 5 µg/sítio, i.t.). Os inibidores foram administrados 2 vezes ao dia (a cada 12 h) até o 7º dia após o primeiro tratamento com PTX. A hiperalgesia mecânica foi avaliada a partir do sétimo dia após o primeiro tratamento com PTX.

3.4 - SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

As seguintes drogas foram utilizadas no presente trabalho: quimiocina derivada de queratinócito recombinante murino, anticorpo anti-CXCL1 murino, DuoSet kits de CXCL1 e IL-1 β foram obtidos da R&D Systems (USA); Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Multiplex KitBD™ (USA); gabapentina, guanetidina, indometacina, wortmannin, aprotinina, EDTA, HTAB, peróxido de hidrogênio, TMB, Tween-20 e Tween-80, foram adquiridos da Sigma Chemical Company (USA). NaCl e NaPO₄ adquiridos da Merck (Germany); GF109203X e U73122 (TocrisBioscience, Bristol, Reino Unido); Isoflurano (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil); PTX (Laboratório Dosa S.A., Buenos Aires, Argentina). A síntese do AS605240 foi realizada como descrito anteriormente (CAMPS et al., 2005). O SB225002 foi sintetizado de acordo com White e colaboradores (1999) com algumas modificações.

A CXCL1 foi reconstituída em PBS estéril contendo 0,1 % de albumina sérica bovina e estocada em tubos plásticos siliconizados a -70 °C até o momento do uso. A solução estoque de PTX (6 mg/mL em Cremophor EL®) foi diluída em salina a uma concentração de 0,2 mg/mL (solução de injeção). O anticorpo anti-CXCL1 foi reconstituído em PBS estéril e estocado em tubos plásticos siliconizados a -70 °C até o momento do uso. O SB225002 foi diluído em salina com 1% de Tween-80. A indometacina foi diluída em Na₂CO₃ 5%. As demais drogas foram diluídas em solução de NaCl 0,9% (p/v) (salina) antes do uso. As doses e protocolos de administração foram baseados em dados prévios do laboratório (QUINTÃO et al., 2006; BENTO et al., 2008; MANJAVACHI et al., 2010 a,b).

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 3-5 animais para os experimentos moleculares e de 6-8 animais para os experimentos comportamentais. As porcentagens de inibição estão apresentadas como a média \pm erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual. A análise estatística dos experimentos comportamentais com decurso temporal foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni. Para os dados de MPO, ELISA, utilizou-se a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,05 (*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises

estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

4 – RESULTADOS

4.1 – INJEÇÃO INTRANEURAL DA QUIMIOCINA CXCL1 EM CAMUNDONGOS

4.1.1 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DA QUIMIOCINA CXCL1 SOBRE A SENSIBILIDADE MECÂNICA E TÉRMICA

A fim de avaliar o papel da quimiocina CXCL1 como um indutor de comportamento do tipo dor neuropática em camundongos, foi padronizado um modelo de hiperalgesia de longa duração induzida através da injeção intraneural (i.n.) de CXCL1 no nervo ciático. Para tal, avaliamos a hiperalgesia mecânica em camundongos que receberam a injeção i.n. de CXCL1 (1,25-125 fg/sítio) no nervo ciático direito. Como observado na figura 1, após a administração i.n. da quimiocina CXCL1 os animais desenvolveram aumento na sensibilidade ao estímulo mecânico, evidenciado pela maior percentagem de retirada da pata frente à aplicação do filamento de von Frey. A redução significativa do limiar de retirada ocorreu 3 dias após a injeção das maiores doses de CXCL1 (12,5 e 125 fg/sítio), e este efeito persistiu por até 10 dias quando comparado com o grupo tratado apenas com o veículo (Figura 1). Já a menor dose de CXCL1 (1,25 fg/sítio) causou hipersensibilidade mecânica somente no 5º dia após a injeção (Figura 1).

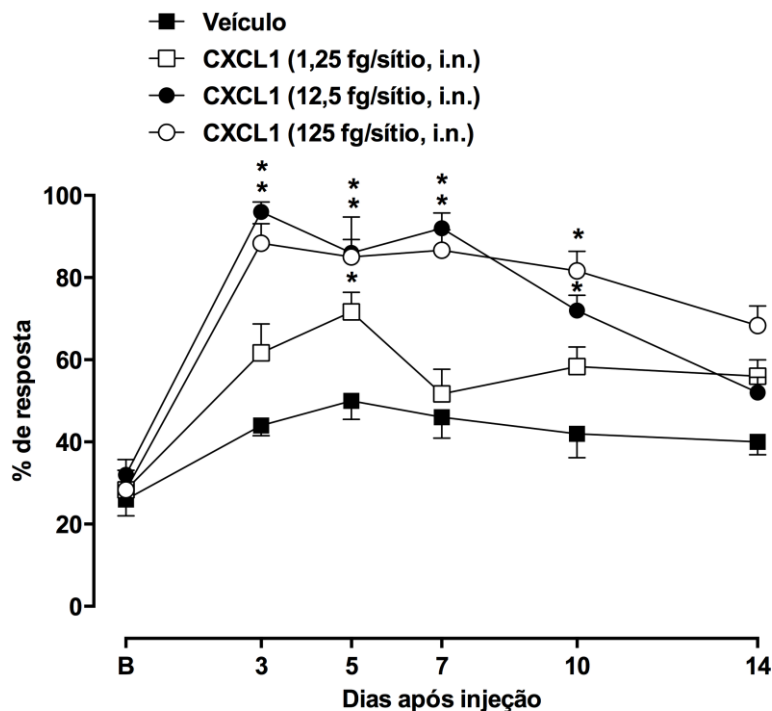


Figura 1 – A quimiocina CXCL1 induz hiperalgesia mecânica após a injeção no nervo ciático de camundongos. A injeção intraneural de 12,5 e 125 fg/sítio de CXCL1 reduziu significativamente o limiar mecânico entre 3 e 10 dias após a administração. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni). B, limiar basal.

Neste bloco de experimentos também foi avaliado o possível desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor pela injeção i.n. de CXCL1. No entanto, os resultados apresentados quanto à hiperalgesia térmica ao calor (Figura 2) após a administração da quimiocina não foram tão relevantes quanto os demonstrados anteriormente. Conforme representado na figura 2, a administração de CXCL1 (12,5 fg/sítio) no nervo ciático reduziu de maneira significativa o limiar térmico apenas no terceiro dia após a injeção quando comparado ao grupo controle, retornando aos valores basais a partir do 5º dia.

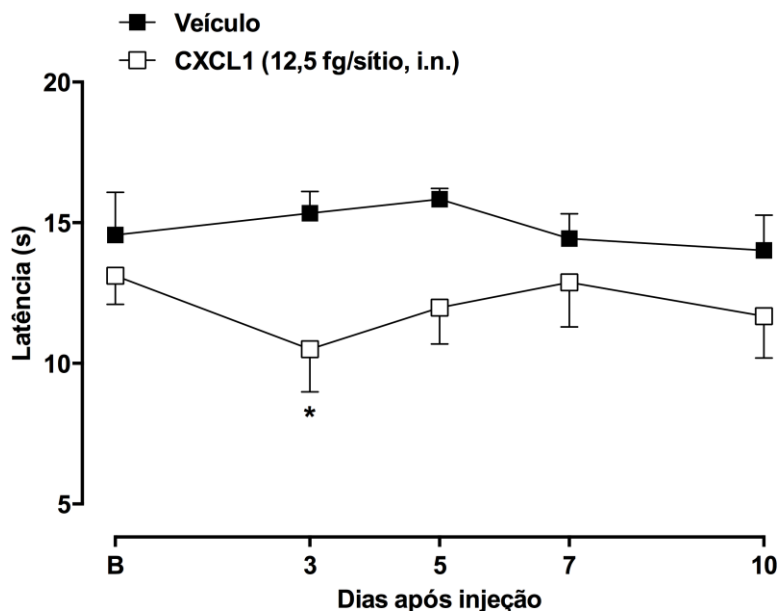


Figura 2 – A quimiocina CXCL1 induz hiperalgesia térmica ao calor transitória após a injeção no nervo ciático de camundongos. A injeção intraneural de 12,5 fg/sítio de CXCL1 reduziu significativamente o limiar térmico apenas no 3º dia após sua administração. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.1.2 – EFEITO DO TRATAMENTO COM GABAPENTINA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

O próximo objetivo do presente trabalho foi caracterizar farmacologicamente o modelo de hiperalgesia de longa duração induzida pela injeção i.n. de CXCL1 no nervo ciático. Para isso, foi realizado o tratamento com a gabapentina, anticonvulsivante amplamente utilizado na terapia para dor neuropática em humanos. Como observado na figura 3, o tratamento sistêmico com a gabapentina (70 mg/Kg, v.o.) no terceiro dia após a administração de CXCL1

reduziu significativamente a resposta de hiperalgesia mecânica, efeito observado até 6 horas após o tratamento, quando comparado com o grupo controle.

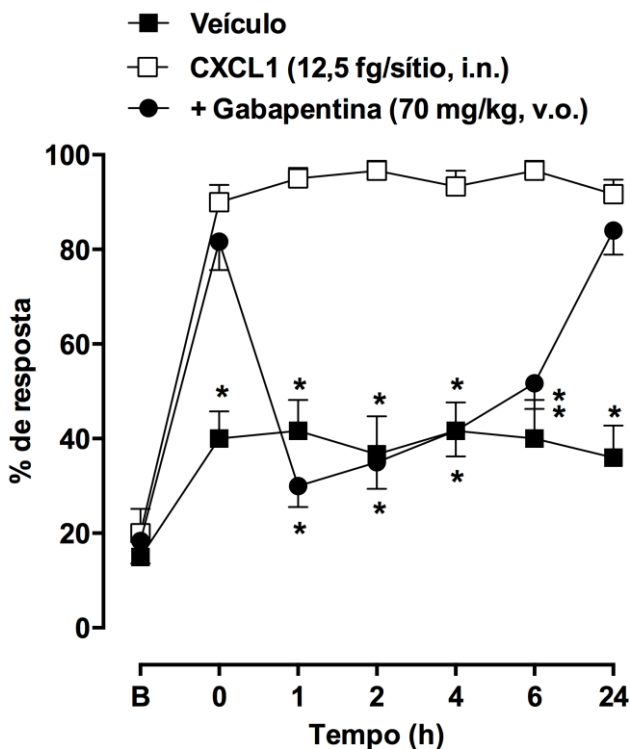


Figura 3 – Efeito do tratamento com gabapentina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n.de CXCL1. A hiperalgesia mecânica induzida por CXCL1 é diminuída em animais pré-tratados com gabapentina (70 mg/kg, v.o.), quando comparada ao grupo tratado com veículo. Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.1.3 – EFEITO DO TRATAMENTO COM SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

Com o intuito de avaliar a dependência da ativação do receptor da quimiocina CXCL1 (receptor CXCR2) neste modelo, os animais foram tratados com o antagonista seletivo deste receptor, SB225002 (3 mg/kg, i.p.), durante três dias (2x/dia) consecutivos. A figura 4 demonstra que a hiperalgesia mecânica induzida pela administração i.n. de CXCL1 foi inibida significativamente pelo tratamento com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 até 4 dias após a injeção i.n. da quimiocina. Sugerindo assim, a dependência da ativação do receptor CXCR2 na fase inicial desta resposta.

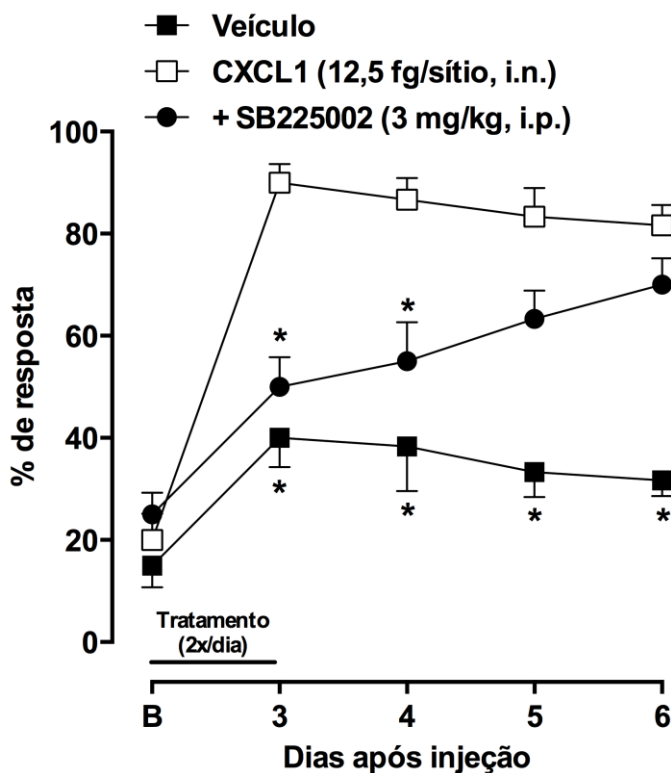


Figura 4 – Efeito do tratamento com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraneural de CXCL1. A resposta nociceptiva mecânica induzida por CXCL1 foi diminuída por até 4 dias após a injeção i.n. em animais pré-tratados com o SB225002 (3 mg/kg, i.p.). Cada grupo representa a média de 6-7 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.1.4 – AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

Tendo em vista a eficácia do tratamento com o antagonista do receptor CXCR2 na hiperalgesia mecânica induzida pelo CXCL1, a qual sugere a dependência da ativação deste receptor no modelo, e

levando-se em consideração a resposta funcional do receptor CXCR2 frente à migração de neutrófilos, o próximo objetivo do trabalho foi avaliar a participação da migração deste tipo celular no modelo de dor prolongada induzida pelo CXCL1. Para tal, foi quantificada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no nervo ciático de camundongos em diferentes períodos de tempo após a administração i.n. da quimiocina. A MPO é um indicador indireto da migração de neutrófilos. A atividade da enzima MPO encontrou-se significativamente aumentada no nervo ciático após 1 h da injeção i.n. CXCL1, e permaneceu elevada até o 3º dia quando comparada ao grupo controle veículo (Figura 5A).

Levando-se em consideração os resultados anteriores e a fim de avaliar a participação da migração de neutrófilos sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraneural de CXCL1, os animais foram previamente tratados com vimblastina (5 mg/Kg, i.v.), com o objetivo de depletar esta população de células inflamatórias. A figura 5B ilustra o efeito inibitório do tratamento com a vimblastina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de CXCL1 no nervo ciático. Este efeito pode ser observado por até cinco dias após a injeção intraneural da quimiocina quando comparado ao grupo controle, indicando que a hiperalgesia mecânica deste modelo é dependente da migração de neutrófilos (Figura 5B).

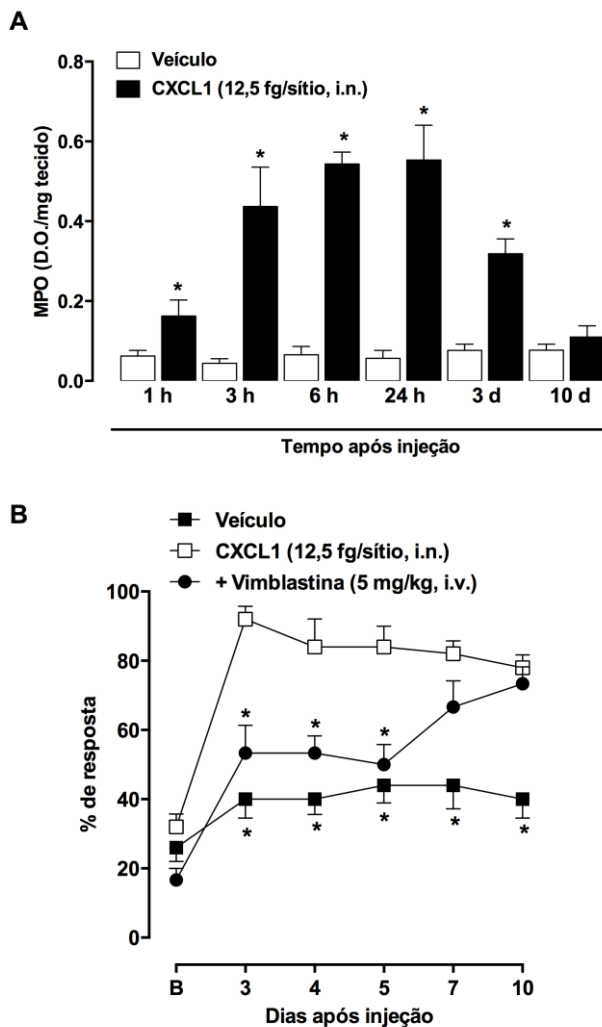


Figura 5 – A hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n. de CXCL1 depende da migração de neutrófilos. Após a administração i.n. de CXCL1 ocorre aumento significativo na atividade da enzima MPO no nervo ciático por até 3 dias, indicando o influxo de neutrófilos para o local (A). O tratamento com o vimblastina (5mg/kg, i.v.) reduz de maneira significativa a resposta nociceptiva causada por CXCL1, efeito observado até 5 dias após sua injeção i.n. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido por Dunnet (A) ou ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni (B)). B, limiar basal.

É importante ressaltar que o tratamento com vimblastina reduziu significativamente a contagem diferencial de neutrófilos no sangue de camundongos em comparação com o grupo veículo no 3º (Tabela 1) e no 10º dia (dados não demonstrados) após o tratamento. Este resultado indica que houve depleção dessa população celular (Tabela 1). No entanto, não foi observada perda de peso, alteração na temperatura ou nos sinais aparentes de mal-estar animal após o tratamento com vimblastina (dados não demonstrados).

Tabela 1 – Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de animais no 3º dia após o tratamento com vimblastina ou controle. Resultados expressos como média de cada grupo.

	Contagem total	Contagem diferencial			
		% Linfócitos	% Neutrófilos	% Monócitos	% Eosinófilos
Veículo	11,7x10 ³ /μL	82,8	17,1	0,1	0
Vimblastina	10,2x10 ³ /μL	93,5	0,2	6,3	0

4.1.5 – AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

Neste bloco de experimentos avaliou-se a possível liberação de diferentes citocinas após a injeção intraneural de CXCL1. Para isso, foram quantificados os níveis de IL-1 β , IL-6, CCL2 e TNF- α no nervo ciático de camundongos em diferentes períodos de tempo após a administração de CXCL1. Conforme mostra a figura 6 ocorreu aumento significativo da liberação da IL-1 β (Figura 6A) e IL-6 (Figura 6B) a partir de 1 h após a injeção da quimiocina CXCL1, permanecendo seus níveis aumentados por até 24h quando comparados ao grupo controle (veículo). De maneira semelhante, o nível de CCL2 aumentou a partir de 3 h após a injeção de CXCL1, e permaneceu elevado por até 3 dias (Figura 6C). Por outro lado, os níveis teciduais de TNF- α não foram alterados de maneira significativa após a administração de CXCL1 em qualquer ponto de tempo analisado (Figura 6D).

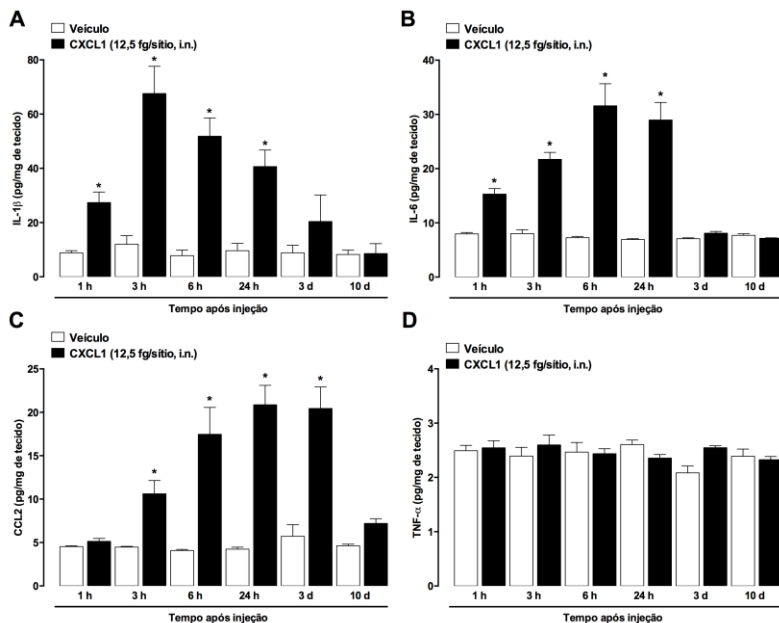


Figura 6 – A injeção i.n. da quimiocina CXCL1 aumentou os níveis da citocina IL-1 β (A), IL-6 (B) e CCL2 (C), mas não os de TNF- α (D) no nervo ciático de camundongos. Os níveis de citocinas foram quantificados por ELISA (IL-1 β) ou CBA (IL-6 e CCL2 e TNF- α) entre 1h e 10 dias após a injeção de CXCL1 (12,5 fg/sítio, i.n.). Cada grupo representa a média de 5 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* P <0,05, ANOVA de uma via, seguido por Dunnet).

4.1.6 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE PRODUTOS DE CICLOOXIGENASES E DA LIBERAÇÃO DE CATECOLAMINAS NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRANEURAL DE CXCL1

As respostas nociceptivas de uma maneira geral podem ser mediadas pela liberação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 1992; VERRI et al., 2006). Com o intuito de determinar a participação dos produtos da ciclooxigenase e também de aminas simpáticas sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de CXCL1 no nervo ciático, diferentes grupos de animais foram tratados com indometacina (5 mg/Kg, v.o.), inibidor não seletivo da

COX 1/2, ou com guanetidina (30 mg/Kg, s.c.), inibidor da liberação de catecolaminas. Como observado na figura 7A, o tratamento com a indometacina reduziu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica induzida injeção i.n. de CXCL1 até quatro dias após a indução do modelo. Contudo, a hiperalgesia prolongada induzida pelo CXCL1 parece não depender da liberação de aminas simpatomiméticas, pois o tratamento com guanetidina não interferiu com esta resposta quando comparado com o grupo controle (Figura 7B).

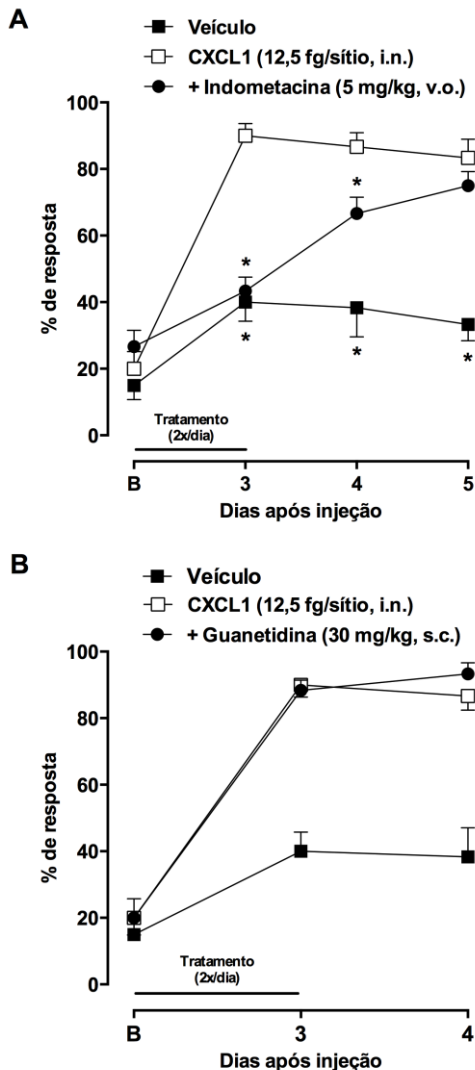


Figura 7 – Avaliação do envolvimento de produtos de ciclooxigenases e da liberação de catecolaminas nas respostas nociceptivas induzidas pela administração i.n. de CXCL1. A hiperalgesia mecânica induzida pelo CXCL1 (12,5 fg/sítio, i.n.) é reduzida pelo tratamento com indometacina (A), mas não com a guanetidina (B). Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.2 – ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELA LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO

Considerando que a injeção i.n. de CXCL1 causou comportamento e alterações inflamatórias característicos de dor crônica quando injetada no nervo ciático de camundongos, na segunda etapa deste estudo procurou-se avaliar a possível contribuição desta quimiocina sobre a dor neuropática, utilizando o modelo animal de ligação parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos.

4.2.1 – QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA A QUIMIOCINA CXCL1 APÓS A LPNC EM CAMUNDONGOS

Neste bloco de experimentos procurou-se avaliar se a lesão neural altera a expressão do RNAm de CXCL1 no tecido periférico (nervo ciático) e central (medula espinhal), por meio da técnica de PCR em tempo real, em diferentes tempos após a LPNC. Conforme representado na figura 8, detectou-se expressão basal do RNAm para a quimiocina CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal (Figura 8A e 8B). A cirurgia de LPNC aumentou a expressão do RNAm para a quimiocina tanto no nervo ciático (Figura 8A), quanto na medula espinhal (Figura 8B), quando comparada com o grupo falso-operado. Esse aumento caracterizou-se por ser tempo dependente, e significativo a partir de 1h alcançando seu pico máximo 6h após a indução da neuropatia no nervo ciático (Figura 8A), enquanto que na medula espinhal este aumento só foi observado na primeira hora após a cirurgia (Figura 8B).

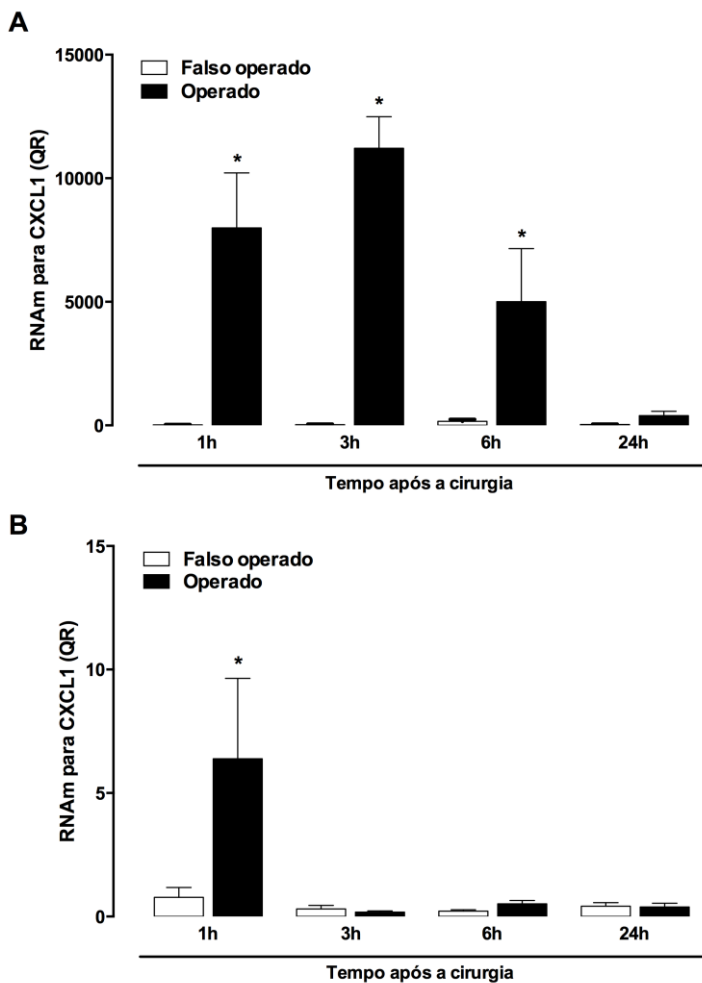


Figura 8 – Expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 no nervo ciático e na medula espinal após LPNC em camundongos. A LPNC induziu o aumento da expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 em diferentes tempos no nervo ciático (A) e apenas em 1h na medula espinal (B), quando comparados com animais falso operados. Cada grupo representa a média de 5 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo teste t de Student). Todos os dados foram normalizados para níveis de expressão de GAPDH dentro da mesma amostra.

4.2.2 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CXCL1 NO NERVO CIÁTICO E NA MEDULA ESPINHAL APÓS LPNC EM CAMUNDONGOS

A fim de avaliar se o aumento na expressão do RNAm para a CXCL1 repercute em alterações nos níveis desta quimiocina, a concentração de CXCL1 em tecidos envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo foi avaliada por ELISA, em diferentes períodos de tempo após a LPNC. Uma hora após a LPNC, foi observado aumento significativo nos níveis de CXCL1 no nervo ciático (Figura 9A), efeito esse que permaneceu aumentado por até 24 h após a cirurgia, quando comparado com o grupo falso operado. Resultado semelhante foi observado na medula espinal, onde os níveis aumentados de CXCL1 foram detectados até 24 h após o procedimento cirúrgico (Figura 9B).

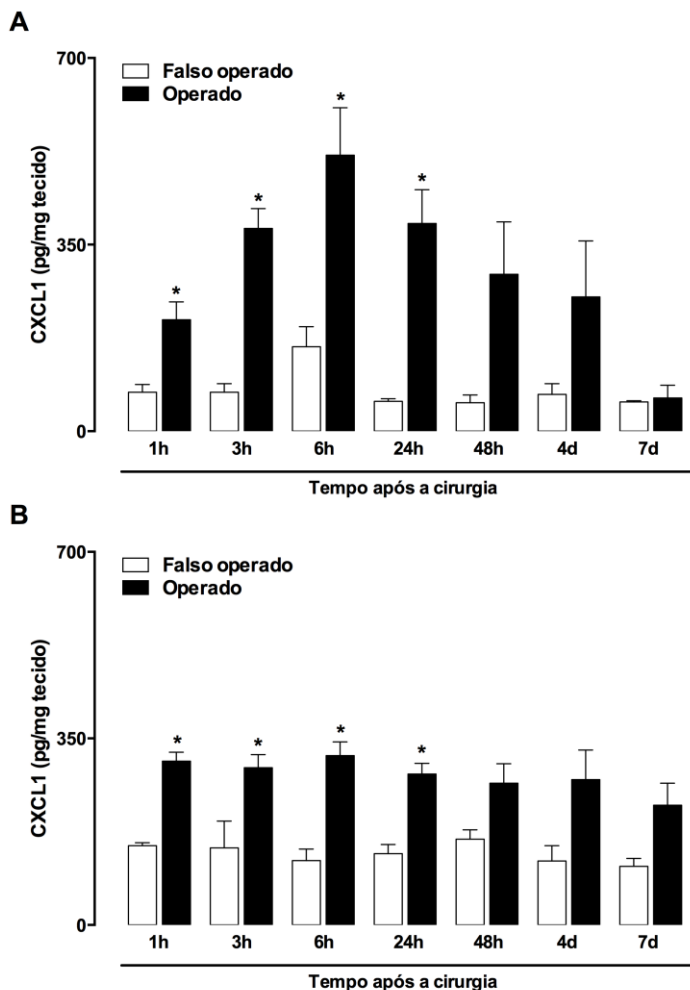


Figura 9 – Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático e medula espinhal após LPNC em camundongos. Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático (A) e da medula espinhal (B) aumentaram significativamente após LPNC quando comparados com o grupo falso operado. Cada grupo representa a média de 5 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido de Dunnett).

4.2.3 – AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO MODELO ANIMAL DE LPNC

Com o intuito de aferir a possível participação da migração de neutrófilos no modelo animal de LPNC assim como demonstrado anteriormente no modelo animal de dor prolongada induzida pela injeção i.n. de CXCL1, foi quantificada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no nervo ciático e na medula espinhal de camundongos em diferentes períodos de tempo após a LPNC. A atividade da enzima mieloperoxidase foi encontrada aumentada em ambos os tecidos avaliados. Como ilustrado na figura 10A, a LPNC aumentou a atividade da enzima MPO no nervo ciático em 1 h, a qual manteve-se significativamente elevada até 4 dias após a cirurgia. De maneira semelhante, a atividade da enzima na medula espinhal aumentou a partir de 1 h e permaneceu significativamente elevada até o 10º dia após a LPNC (Figura 10B). Estes resultados indicam que o aumento dos níveis de CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal após a LPNC é precedida pela migração de neutrófilos para estes sítios, sugerindo uma relação entre estes eventos para a indução das respostas hiperalgésicas associadas ao modelo de LPNC.

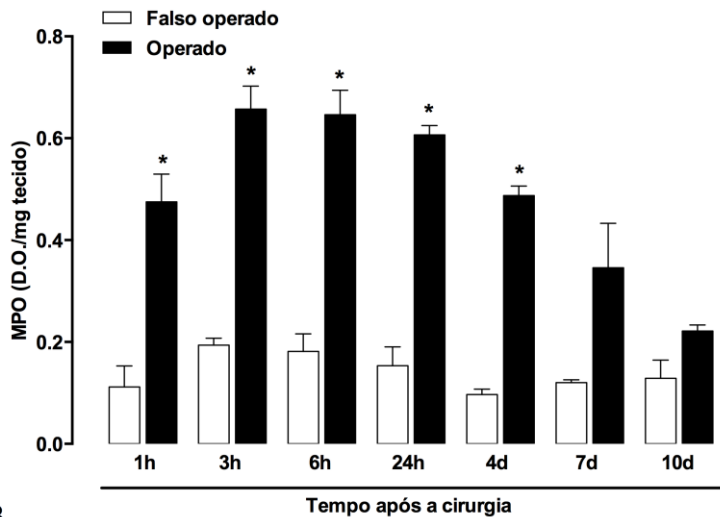
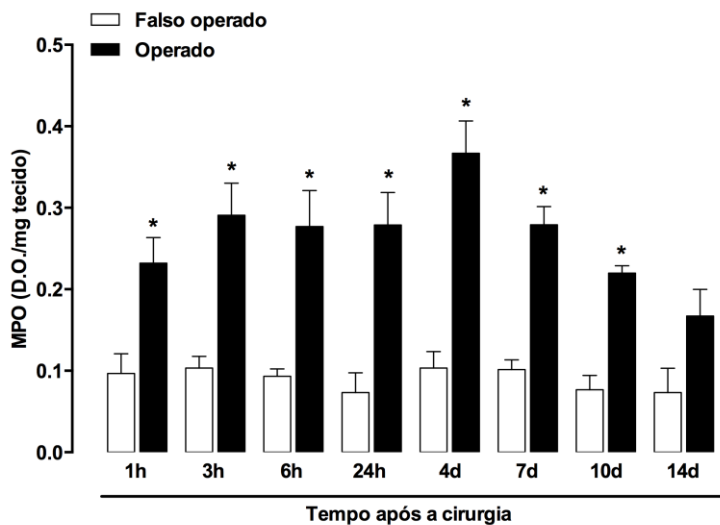
A**B**

Figura 10 – A LPNC induz aumento da migração de neutrófilos tanto na periferia, como na medula espinhal. Após a LPNC ocorre aumento significativo na atividade da enzima MPO no nervo ciático (A) e medula espinhal (B) até 4 e 10 dias após a cirurgia, respectivamente. Cada grupo representa a média de 5 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido por Dunnet).

4.2.4 – EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA LPNC

Levando-se em conta os resultados obtidos nos experimentos anteriores e a fim de avaliar a contribuição da migração de neutrófilos para a hiperalgesia induzida pela LPNC, os animais foram previamente tratados com vimblastina (5 mg/Kg, i.v.) com o objetivo de depletar estas células inflamatórias. A figura 11 ilustra o efeito inibitório do tratamento com a vimblastina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC. Este efeito pode ser observado por até sete dias, indicando que a hiperalgesia induzida pela cirurgia é dependente da migração de neutrófilos.

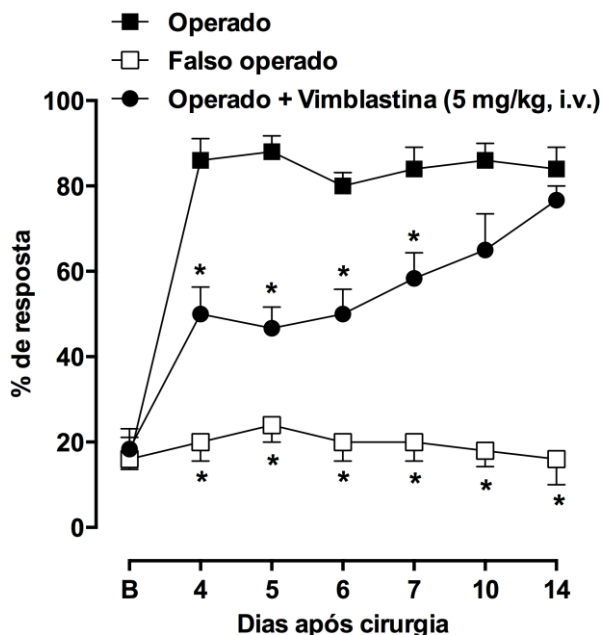


Figura 11 – A depleção de neutrófilos reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC. Efeito do tratamento com vimblastina (5mg/kg, i.v.) sobre a hiperalgesia induzida pela ligação. O tratamento com o quimioterápico reduz de maneira significativa a resposta nociceptiva causada pela LPNC, efeito observado até 7 dias após a cirurgia. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.2.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA GÊNESE DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC

O próximo objetivo do nosso estudo foi verificar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 nas respostas nociceptivas induzidas pela LPNC. Para isso, foi realizado um primeiro protocolo de tratamento no qual os animais foram tratados com o anticorpo anti-CXCL1 (10 µg/kg, i.v.) no momento da cirurgia. Como ilustrado na figura 12A, o tratamento com o anticorpo anti-CXCL1 foi efetivo em inibir significativamente a hiperalgisia mecânica, efeito observado até o sétimo dia após a LPNC. Do mesmo modo, o tratamento com o anticorpo anti-CXCL1 reduziu a hiperalgisia térmica ao calor porem apenas até o quinto dia da avaliação (Figura 12B).

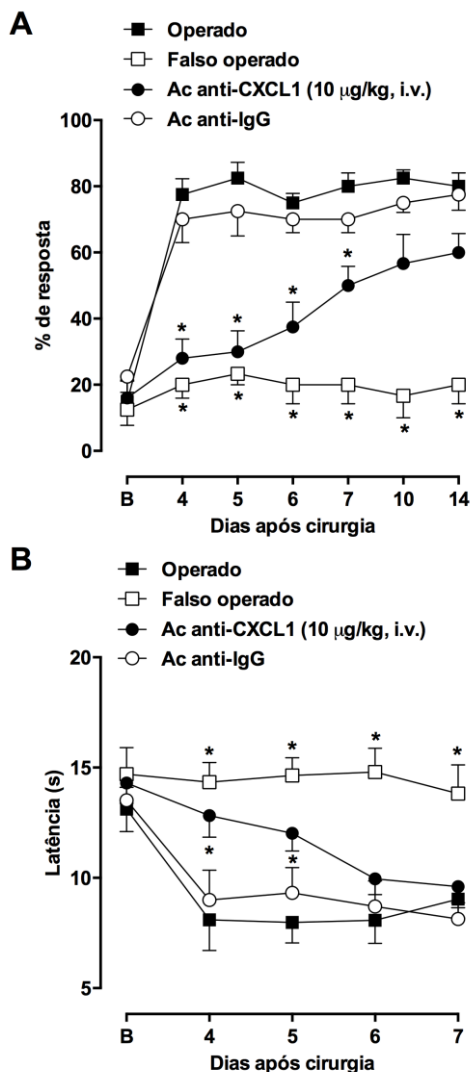


Figura 12 – Efeito do tratamento com anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC. O limiar de retirada da pata a estímulos mecânicos (A) e a latência de retirada da pata ao estímulo térmico (B) em animais operados foi significativamente menor do que os animais tratados com anticorpo anti-CXCL1, no momento da cirurgia. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

Ainda, baseado nos resultados anteriores, avaliou-se se a possível liberação local de CXCL1 estaria envolvida nas respostas hiperalgésicas causadas pela LPNC. Para tal, o anticorpo anti-CXCL1 foi instilado sobre a lesão imediatamente após a cirurgia. A hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC foi significativamente reduzida por até 6 dias após a cirurgia, pela instilação de anticorpo anti-CXCL1 (100 ng/sítio) no nervo ciático (Figura 13A). Resultados semelhantes são observados para a hiperalgesia térmica ao calor, porém a inibição sobre este parâmetro foi menos pronunciada (Figura 13B).

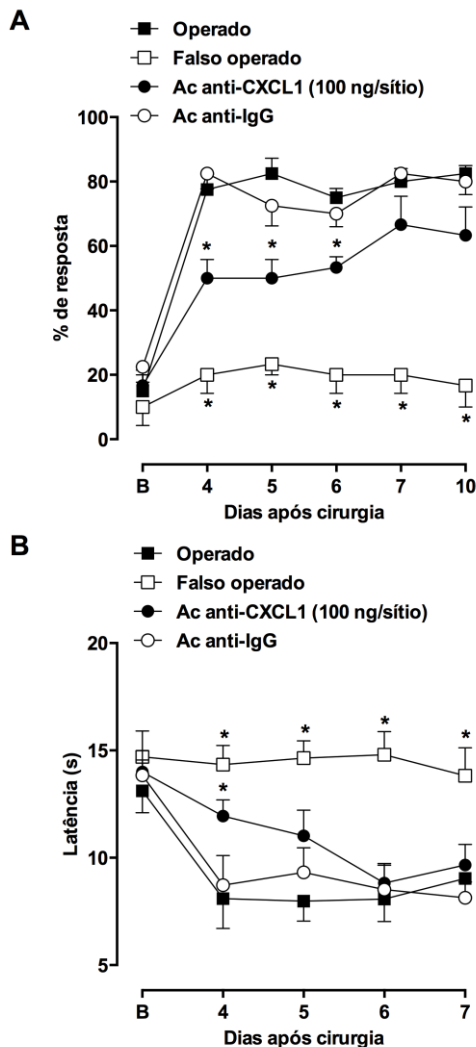


Figura 13 – Efeito do tratamento local com o anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC. As respostas nociceptivas mecânica (A) e térmica ao calor (B) foram significativamente reduzidas em animais tratados localmente com anticorpo anti-CXCL1, administrado no momento da cirurgia. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.2.6 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC

Diante dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, procurou-se avaliar a participação da quimiocina CXCL1 na manutenção da hiperalgesia induzida pela LPNC. Na figura 14 estão demonstrados os efeitos do tratamento sistêmico com o anticorpo anti-CXCL1 (10 µg/Kg, i.v.) administrado no quarto dia após a cirurgia sobre a manutenção da hiperalgesia instalada. De maneira semelhante aos resultados obtidos com o tratamento profilático, a administração terapêutica do anticorpo anti-CXCL1 também inibiu significativamente as respostas nociceptivas mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC, porém estes efeitos persistiram somente por 4 ou 2 h, respectivamente, após a administração do anticorpo (Figura 14A e B).

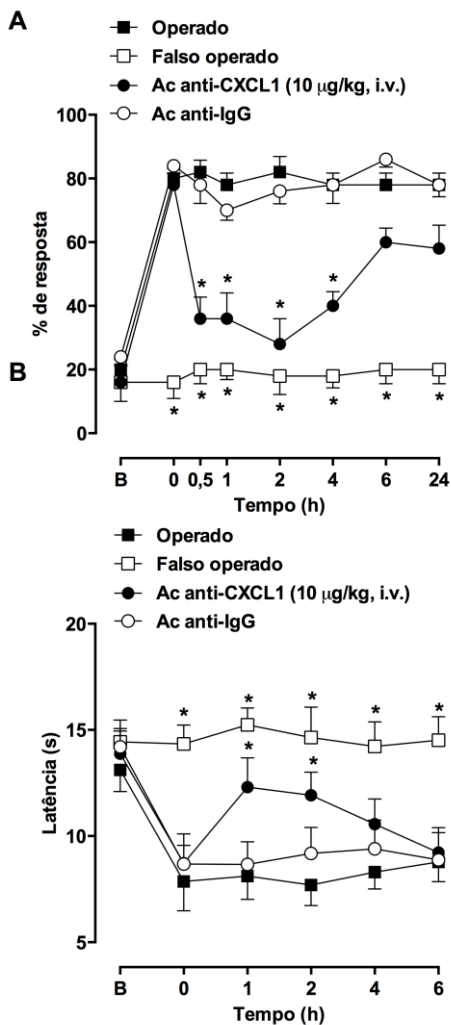


Figura 14 – Efeito do tratamento com o anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor induzidas pela LPNC. O tratamento com anticorpo anti-CXCL1 no quarto dia após a cirurgia reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica (A) e térmica ao calor (B) induzida pela LPNC quando comparados com grupo controle. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.2.7 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL COM O ANTICORPO ANTI- CXCL1 SOBRE A HIPERALGESIA CAUSADA PELA LPNC

Para avaliar o possível envolvimento de vias centrais nas ações moduladoras do CXCL1 sobre a hiperalgesia causada pela LPNC, diferentes grupos de animais foram tratados pela via i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 no momento ou 4 dias após a cirurgia. A administração do anticorpo anti-CXCL1 (1 ng/sítio, i.t.) no momento da cirurgia inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica por até 5 dias após a LPNC (Figura 15A). Como representando na figura 15B, o tratamento i.t. com o anticorpo no quarto dia após a cirurgia também inibiu a hiperalgesia mecânica estabelecida por até 4 horas.

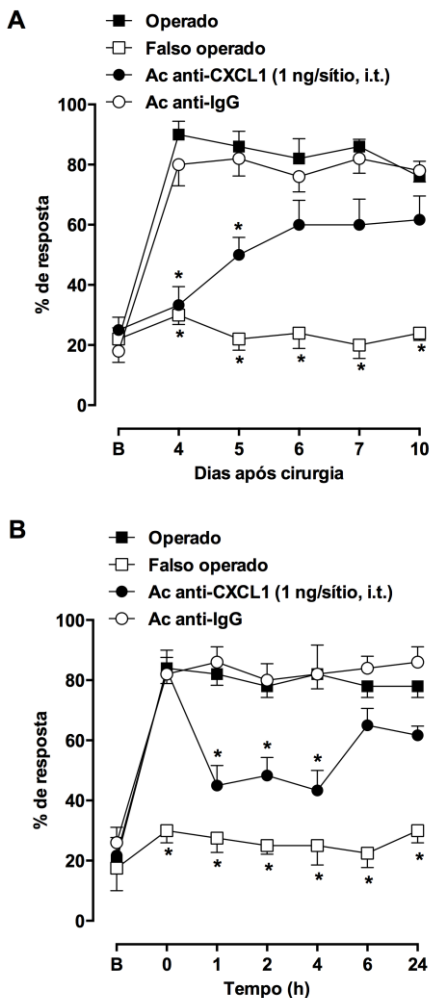


Figura 15 – A inibição espinal de CXCL1 diminui a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC. (A) Tratamento intratecal com anticorpo anti-CXCL1 no momento da cirurgia reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC entre os dias 4 e 5 após a cirurgia. Ainda, a administração i.t. de anticorpo anti-CXCL1 no 4º dia após a LPNC reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica entre 1 e 4 horas após cirurgia. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.2.8 – AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA LIBERAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS APÓS A LPNC

Uma vez que a injeção i.n. de CXCL1 causou aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no nervo ciático, e tendo em vista que a lesão do nervo ciático aumentou os níveis de CXCL1 localmente, avaliou-se a possível contribuição desta quimiocina para a liberação de citocinas pró-inflamatórias após a LPNC. Assim, foram quantificados os níveis de IL-1 β , IL-6, CCL2 e TNF- α no nervo ciático de animais submetidos a LPNC e tratados com o anticorpo anti-CXCL1 (10 μ g/Kg, i.v.), administrado logo após a cirurgia. Como observado na figura 16, ocorreu aumento significativo dos níveis de IL-1 β (Figura 16A), IL-6 (Figura 16B), CCL2 (Figura 16C) e TNF- α (Figura 16D) no nervo ciático 12 h após a LPNC quando comparado com o grupo falso operado. O tratamento com anticorpo anti-CXCL1 no momento da cirurgia inibiu significativamente os níveis de IL-1 β (Figura 16A) e IL-6 (Figura 16B) quando comparados ao grupo controle (veículo). Em contrapartida, os níveis teciduais tanto da citocina CCL2 (Figura 16C), quanto de TNF- α (Figura 16D) não reduziram após o tratamento com o anticorpo anti-CXCL1.

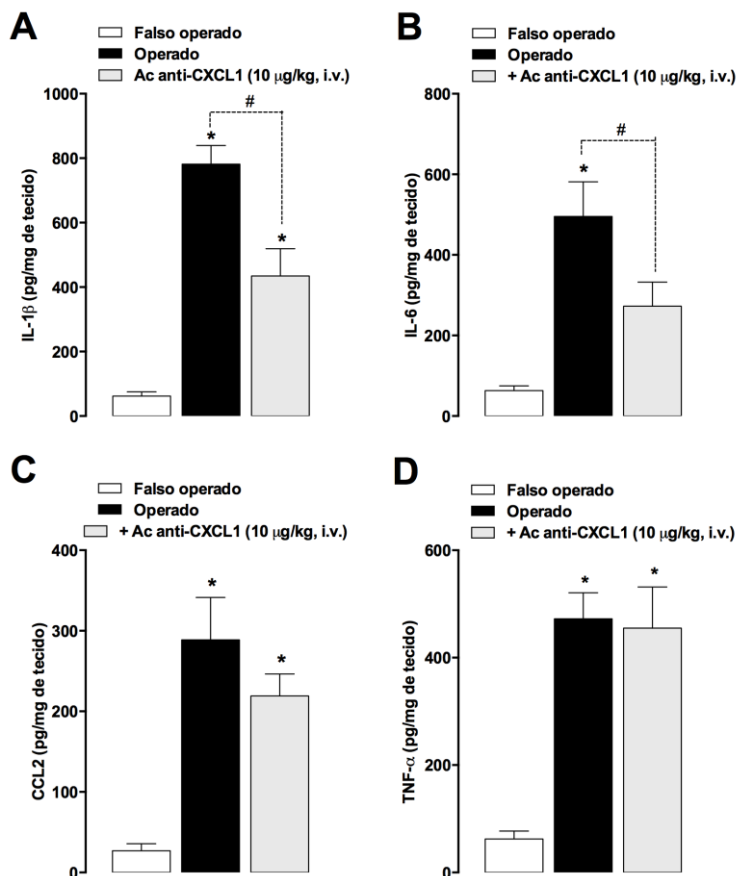


Figura 16 – O tratamento com anticorpo anti-CXCL1 reduz os níveis de IL-1 β (A) e IL-6 (B), mas não os de CCL2 (C) e TNF- α (D) no nervo ciático de camundongos após a LPNC. Os níveis de citocinas foram quantificados por ELISA (IL-1 β) e CBA (IL-6, CCL2 e TNF- α) 12h após a LPNC. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido por Dunnett).

4.3 – ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA NEUROPATIA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Na última etapa do presente trabalho verificou-se se os achados descritos acima estenderiam-se para um modelo de dor neuropática que não fosse dependente de lesão direta de nervos. Para tal, nos propusemos a estudar o possível envolvimento da quimiocina CXCL1 no modelo de neuropatia periférica induzida pelo quimioterápico paclitaxel (PTX) em camundongos.

4.3.1 – QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA A QUIMIOCINA CXCL1 APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL

Inicialmente foi avaliada a expressão do RNAm para a CXCL1 em tecidos envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo (GRD e medula espinhal), por meio da técnica de PCR em tempo real, em animais tratados com PTX (2 mg/Kg, 1 vez ao dia, durante 5 dias consecutivos) em diferentes períodos de tempo. Conforme representado na figura 17, detectou-se expressão basal do RNAm para a CXCL1 no GRD e na medula espinhal. A expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 está aumentada tanto no GRD, como na medula espinhal de camundongos após o tratamento com PTX. Este aumento é significativo a partir de 8 h, permanecendo elevado até 24 h após o início do tratamento com o quimioterápico no GRD (Figura 17A). Do mesmo modo, foi observado um aumento significativo da expressão do RNAm para CXCL1 na medula espinhal (segmentos L4-L6) a partir de 12h após a administração de PTX, efeito observado até 3 dias quando comparado ao grupo controle (Figura 17B).

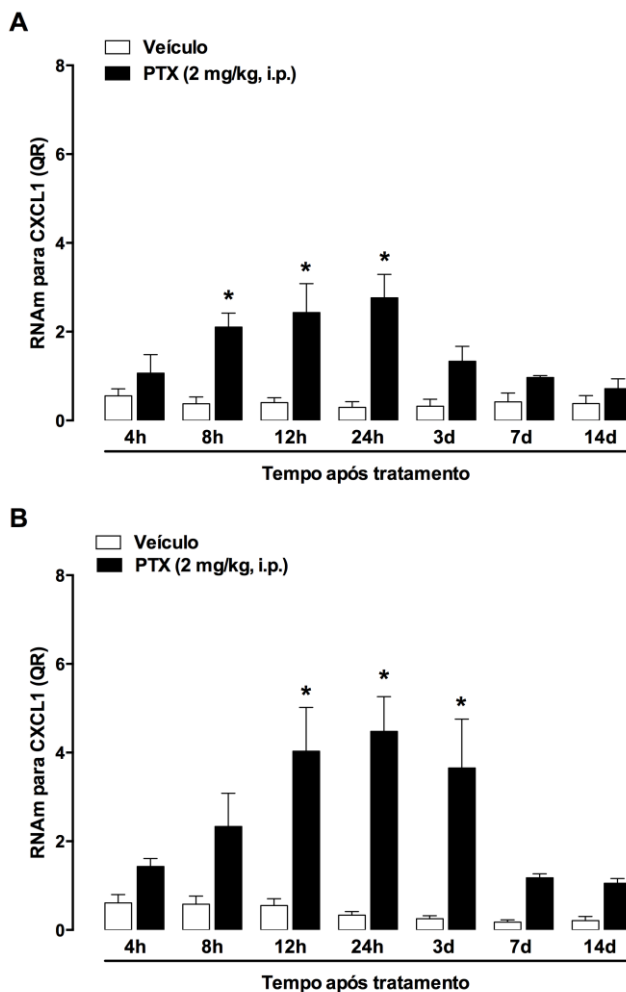


Figura 17 – Expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1 no GDR e na medula espinal após o tratamento com PTX em camundongos. A administração sistêmica de PTX induziu o aumento da expressão de RNAm para a quimiocina CXCL1 em diferentes tempos no GRD (A) e na medula espinal (B), quando comparados com animais que receberam veículo. Cada grupo representa a média de 4 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo teste t de Student). Todos os dados foram normalizados para níveis de expressão de GAPDH dentro da mesma amostra.

4.3.2 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CXCL1 NO NERVO CIÁTICO E NA MEDULA ESPINHAL APÓS O TRATAMENTO COM PACLITAXEL

Nosso próximo objetivo foi avaliar se o tratamento com o PTX altera os níveis da citocina CXCL1 no tecido periférico (nervo ciático) e central (medula espinhal), em diferentes períodos de tempo após o tratamento com o quimioterápico. Conforme pode ser observado na figura 18A, o tratamento com o PTX não aumentou os níveis da quimiocina CXCL1 de maneira significativa no nervo ciático, nos períodos de tempo avaliados. Por outro lado, foi observado aumento significativo nos níveis de CXCL1 na medula espinhal (L4-L6) 12 horas após o tratamento com este quimioterápico (Figura 18B). Este efeito permaneceu aumentado até o sétimo dia após o tratamento, quando comparado com o grupo controle (veículo) (Figura 18B).

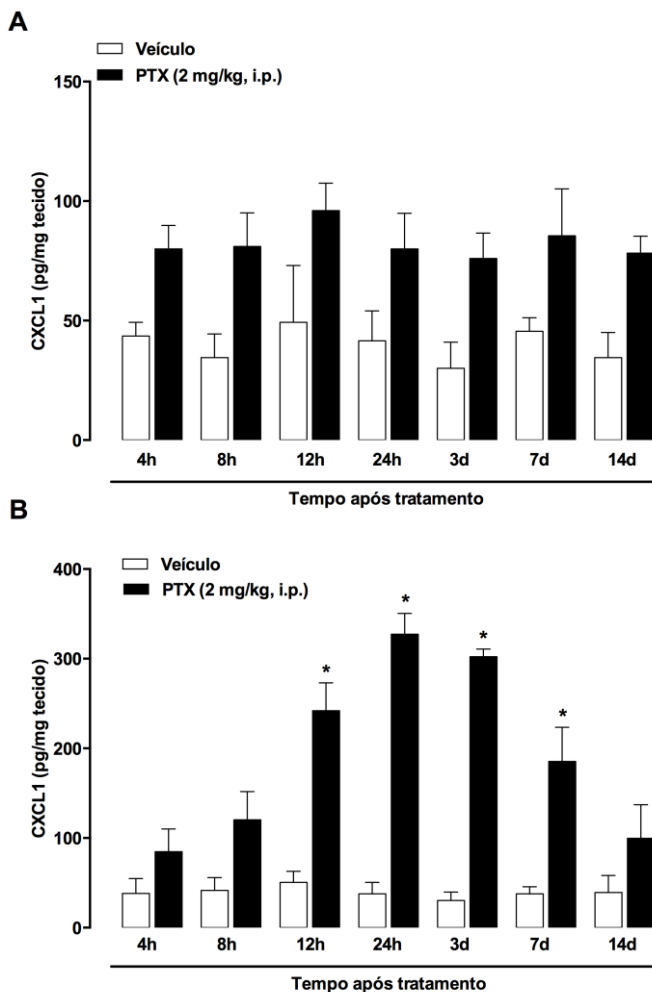


Figura 18 – Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal após o tratamento com PTX em camundongos. Níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático (A) não aumentaram após o tratamento com PTX. Já na medula espinhal (B) ocorreu um aumento significativo dos níveis de CXCL1 a partir de 12 horas após o tratamento com o PTX quando comparados com o grupo controle. Cada grupo representa a média de 5 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido de Dunnett).

4.3.3 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 E DO SEU RECEPTOR NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Ainda, com o objetivo de avaliar a participação da quimiona CXCL1 e de seu receptor CXCR2 na neuropatia induzida pelo PTX, foram realizados diferentes tratamentos farmacológicos com o anticorpo anti-CXCL1 ou com o antagonista do receptor CXCR2, SB225002. O tratamento sistêmico com o anticorpo anti-CXCL1 (10 µg/Kg, i.v.) no sétimo dia após o início do tratamento com o PTX inibiu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX apenas na primeira hora após o tratamento, quando comparado ao grupo controle (Figura 19A). Em contrapartida, o tratamento sistêmico com o SB225002 (3 mg/Kg, i.p.) não apresentou eficácia sobre quadro hiperalgésico induzido pelo quimioterápico (Figura 19B).

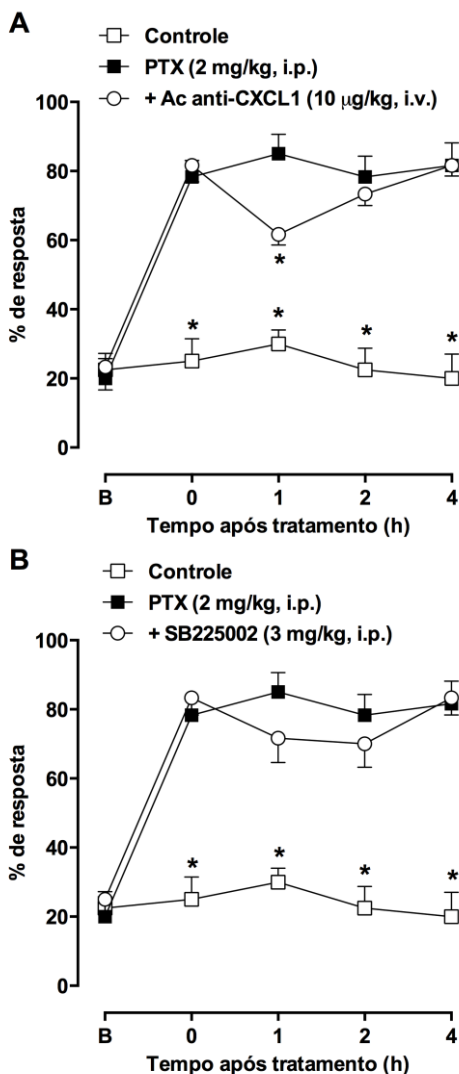


Figura 19 – Comportamentos de dor neuropática induzida pelo PTX em camundongos tratados com anticorpo anti-CXCL1 e SB225002. Efeito do tratamento sistêmico com anticorpo anti-CXCL1 (A) e SB225002 (B) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.3.4 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM ANTICORPO ANTI-CXCL1 E SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Neste bloco de resultados foram avaliados se os tratamentos preventivos com o anticorpo anti-CXCL1 e antagonista do receptor CXCR2, SB225002, são efetivos em prevenir a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Para tal, diferentes grupos de animais foram tratados sistemicamente durante 6 dias, paralelamente ao tratamento com quimioterápico. Conforme ilustrado na figura 20A, a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX foi reduzida de maneira significativa apenas no 7º dia do protocolo experimental. Já o tratamento sistêmico repetido com o SB225002 não foi eficaz em reduzir a resposta nociceptiva induzida pelo quimioterápico (Figura 20B).

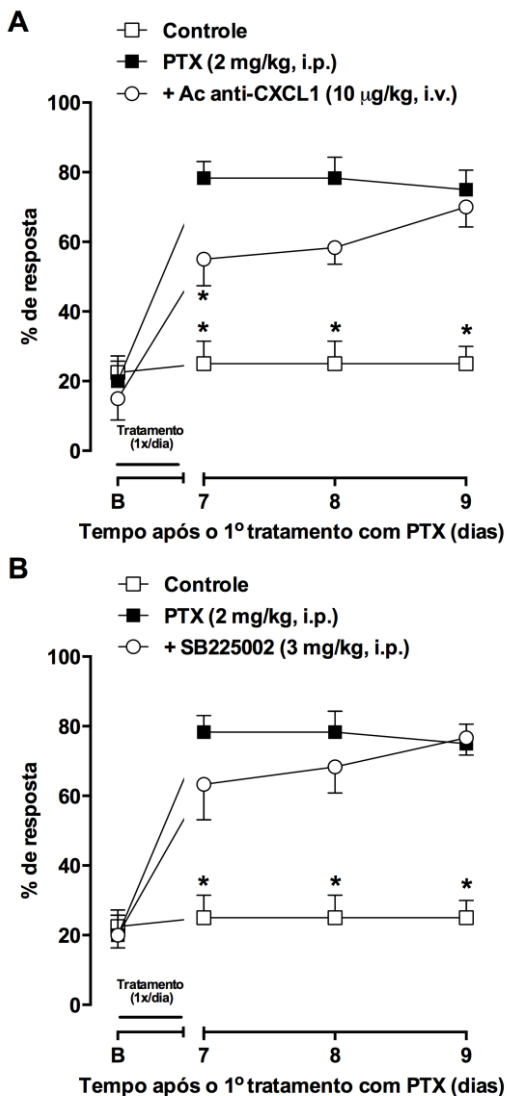


Figura 20 – Comportamentos de dor neuropática induzida pelo PTX em camundongos tratados com anticorpo anti-CXCL1 e SB225002. Efeito do tratamento sistêmico preventivo com anticorpo anti-CXCL1 (A) e SB225002 (B) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* $P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal

4.3.5 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 E DO SEU RECEPTOR NOS MECANISMOS CENTRAIS DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

A participação da quimiocina CXCL1 e do receptor CXCR2 espinhais na hiperalgesia induzida pelo PTX foi avaliada pelo tratamento i.t. com anticorpo anti-CXCL1 (1 ng/sítio) e SB225002 (10 µg/sítio), respectivamente. A figura 21 demonstra que ambos os tratamentos foram eficazes em inibir a hiperalgesia mecânica causada pelo PTX. O tratamento i.t. com anticorpo anti-CXCL1 no 7º dia após o primeiro tratamento com o quimioterápico reduziu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica até 2 h após sua administração (Figura 21A), enquanto o tratamento com SB225002 teve um resposta menos pronunciada, mas ainda sim significativa em 1h após sua administração (Figura 21B).

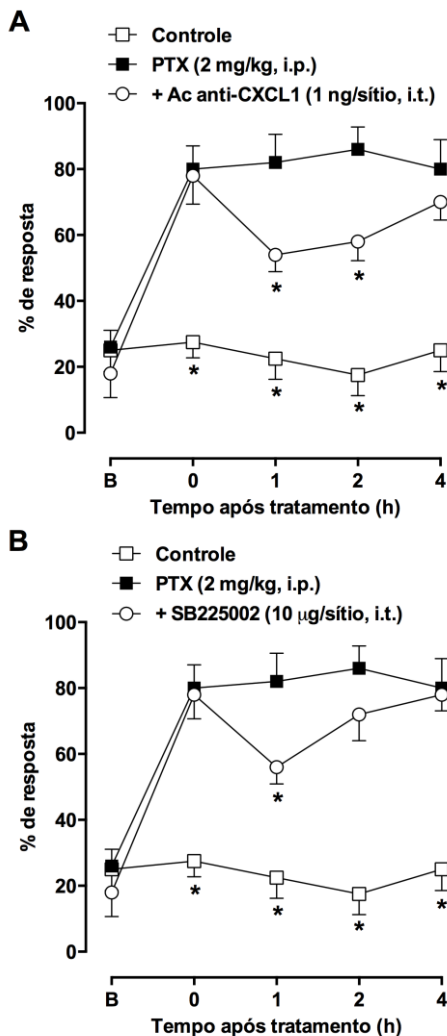


Figura 21 – A quimiocina CXCL1 liberada na medula espinhal, bem como seu receptor expresso na medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 (1ng/sítio) (A) e o antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002 (10µg/sítio) (B) administrados no 7º dia após o primeiro tratamento com PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* P <0,05, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.3.6 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRATECAL PREVENTIVO COM ANTICORPO ANTI-CXCL1 E SB225002 SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO PACLITAXEL

Com o intuito de avaliar a participação da quimiocina CXCL1 e do seu receptor localizados na medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX, foi realizado o tratamento intratecal preventivo com o anticorpo anti-CXCL1 e CXCR2, respectivamente. Para isso diferentes grupos de animais foram tratados pela via i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 (1 ng/sítio) ou com SB225002 (10 µg/sítio) durante 6 dias, paralelamente ao tratamento com o quimioterápico. O tratamento preventivo com o anticorpo anti-CXCL1 inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica até o 9º dia após o início do tratamento com o PTX (Figura 22A). De maneira semelhante, a resposta nociceptiva induzida pelo PTX apresentou-se reduzida até o 8º dia de avaliação após o tratamento com o SB225002 (Figura 22B). Portanto, a liberação da quimiocina CXCL1 e seu receptor (CXCR2) expresso na medula espinhal parecem ser importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX.

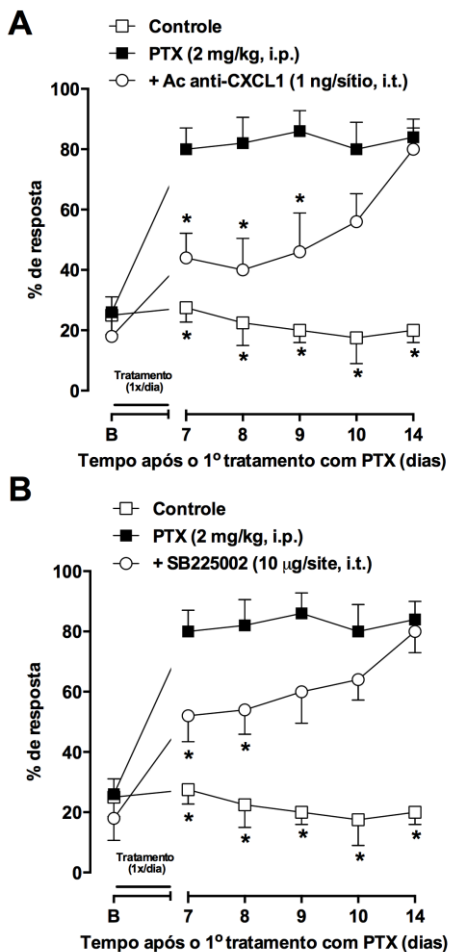


Figura 22 – A quimiocina CXCL1 liberada na medula espinhal, bem como seu receptor expresso na medula espinhal medeiam a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Efeito do tratamento i.t. preventivo com o anticorpo anti-CXCL1 (1ng/sítio) (A) ou com o antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002 (10µg/sítio) (B) sobre a neuropatia periférica induzida pelo PTX. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* P <0,05, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

4.3.7 – ENVOLVIMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DO RECEPTOR CXCR2 NA HIPERALGESIA CAUSADA PELO PTX

As principais vias de sinalização que medeiam as ações após a ativação do receptor CXCR2 são fosfolipase C/proteína quinase C (PLC/PKC) e fosfatidilinositol quinase 3/Akt (PI3K/Akt) (WU et al., 1993; KNALL et al., 1997). Portanto, nos perguntamos se a ativação dessas vias de sinalização também estaria envolvida na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Primeiramente foi avaliada a possível participação da via PLC/PKC. Para isso os animais foram previamente tratados com o inibidor seletivo da enzima PLC, U73122 (30 pmol/sítio, i.t.), e inibidor seletivo da enzima PKC, GF109203X (1 nmol/sítio, i.t.) 2 vezes ao dia (a cada 12 h) até o 7º dia após o primeiro tratamento com PTX. No entanto, o tratamento com o inibidor da PLC não interferiu na hiperalgesia mecânica induzida pela administração de PTX (Figura 23A). Da mesma maneira, a inibição farmacológica da PKC não inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX (Figura 23B).

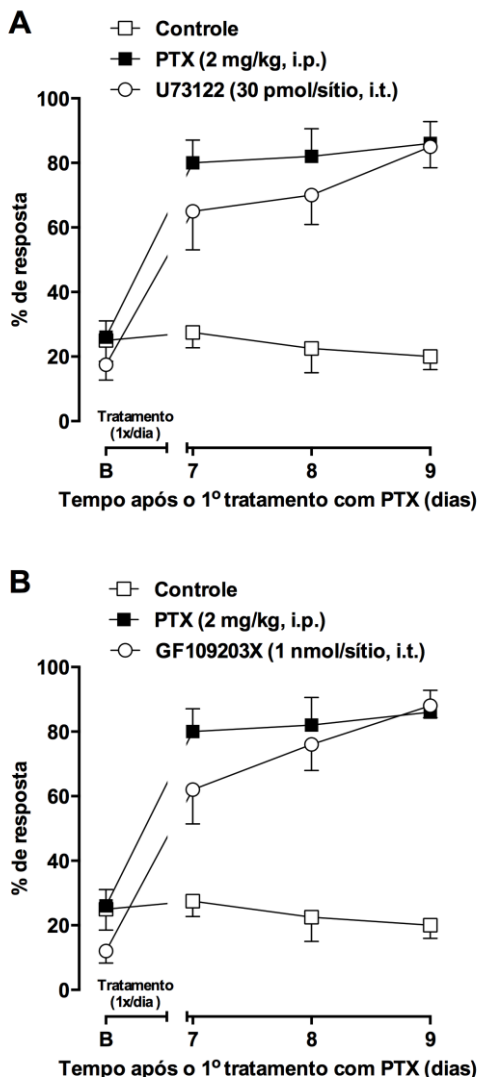


Figura 23 – Efeito do tratamento i.t. preventivo com os inibidores da PLC, U73122 (30pmol/sítio)(A) e PKC, GF109203X (1nmol/sítio) (B) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela neuropatia periférica induzida pelo PTX. O tratamento com os inibidores da via de sinalização PLC/PKC não inibiu a hiperalgesia induzida pelo quimioterápico. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* P <0,05, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

Por outro lado, a resposta nociceptiva induzida pelo PTX foi significativamente prevenida pelo tratamento com o inibidor não seletivo da enzima PI3K. Conforme ilustrado na figura 24A, o tratamento preventivo com wortmannin (0,4 µg/sítio, i.t.) reduziu a hiperalgesia mecânica até o 8º dia após o início do tratamento com o PTX. Da mesma maneira, a hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX foi significativamente prevenida após o tratamento com o inibidor seletivo da PI3Kγ, o AS605240 (5 µg/sítio, i.t.) até o 9º dia de avaliação (Figura 24B), indicando que a ativação desta enzima tem um papel importante sobre estes efeitos.

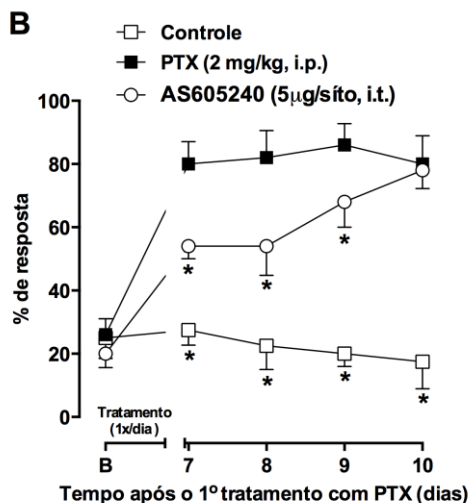
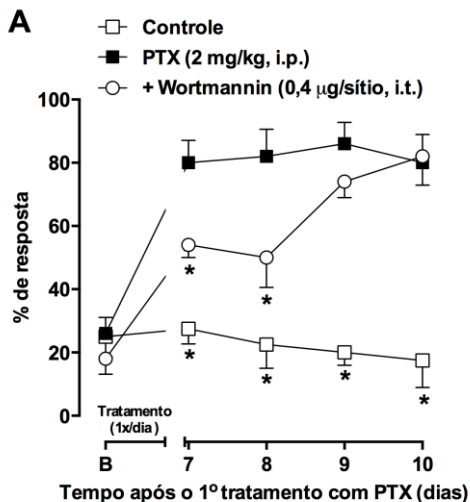


Figura 24 – Efeito do tratamento i.t. preventivo com os inibidores da PI3K, wortmannin (0,4 µg/sítio)(A) e PI3Kγ, AS605240 (5 µg/sítio) (B) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela neuropatia periférica induzida pelo PTX. O tratamento com ambos inibidores reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pelo quimioterápico. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média (EPM) (* P < 0,05, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni). B, limiar basal.

5 – DISCUSSÃO

A dor crônica é um problema grave de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, altera funções físicas, induz ansiedade e depressão, diminuindo acentuadamente a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho do indivíduo, o que acarreta prejuízos substanciais para a sociedade (RUSSO e BROSE, 1998; ASHBURN e STAATS, 1999; TANG e CRANE, 2006). Apesar dos esforços feitos tanto pela academia como pela indústria nas últimas décadas, ainda hoje não existe uma terapia eficaz e segura para tratar os pacientes com dor crônica (O'CONNOR e DWORKIN, 2009; BURGESS e WILLIAMS, 2010; WOOLF, 2010). Portanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos nestas síndromes é de extrema importância para permitir a descoberta de novos alvos moleculares e a partir deles permitir o desenvolvimento de novos analgésicos mais eficazes clinicamente.

Neste contexto, estudos recentes forneceram evidências convincentes de que a neuroinflamação desempenha um papel fundamental na patogênese da dor crônica (SCHOLZ e WOOLF, 2007; REN e DUBNER, 2010; KIGUCHI et al., 2012). Embora seja atualmente bem estabelecido que existam diferenças importantes entre as várias formas de dor crônica, de uma maneira geral, dados da literatura indicam que este tipo de dor depende de alterações celulares que ocorrem no sistema nervoso periférico e central, o que resulta na sensibilização de neurônios responsáveis pela transmissão de sinais dolorosos (SCHOLZ e WOOLF, 2007; BASBAUM et al., 2009). Em relação a dor neuropática, durante o seu desenvolvimento, um conjunto diversificado de células inflamatórias (incluindo monócitos, granulócitos e linfócitos) acumulam em torno dos nervos danificados, e liberam mediadores químicos (como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas), que atuam sinergicamente para induzir e manter a sensibilidade de neurônios nociceptivos, através da alteração de propriedades eletrofisiológicas e moleculares destes neurônios tanto na periferia como na medula espinhal (AUSTIN e MOALEM-TAYLOR, 2010; JI et al., 2014). Sendo assim, é possível sugerir que a modulação da resposta imune frente a lesão do nervo pode servir como ponto de partida para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da dor neuropática em humanos (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

Os achados do presente trabalho não só confirmam mas também estendem os dados existentes na literatura, apontando o potencial envolvimento da quimiocina CXCL1 em modelos animais de dor crônica. Tal hipótese baseia-se nos seguintes achados: i) a injeção intraneural da quimiocina CXCL1 induz hiperalgisia mecânica de longa duração em camundongos; ii) a hiperalgisia mecânica induzida pela CXCL1 parece ser dependente da migração de neutrófilos e da liberação de citocinas próinflamatórias e prostanóides; iii) a LPNC aumentou a expressão do RNAm e os níveis teciduais de CXCL1 no nervo ciático e na medula espinhal de camundongos; iv) o pré e pós-tratamento com anticorpo anti-CXCL1 reduziu a hiperalgisia mecânica e térmica ao calor induzida por LPNC; v) o tratamento dos animais com PTX resultou em aumentosignificativo dos níveis de CXCL1 no GRD e na medula espinhal de camundongos; e vi) o tratamento intratecal com o anticorpo anti-CXCL1 e com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 reduziu a hiperalgisia mecânica induzida pelo PTX.

O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor crônica tem propiciado um melhor entendimento em relação aos mecanismos envolvidos na indução e na manutenção desta condição patológica, além de ser útil no avanço de pesquisas para novas abordagens terapêuticas (MOGIL, 2009). Neste contexto, no presente estudo foi padronizado o modelo experimental de injeção intraneural da quimiocina CXCL1, com o propósito de elucidar a contribuição desta no desenvolvimento da dor neuropática. De fato, a administração i.n. de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , CX3CL1 e IL-17, tem sido utilizada para induzir comportamentos do tipo dor neuropática em roedores (WAGNER e MYERS, 1996; ZELENKA et al., 2005; HOLMES et al., 2008; KIM e MOALEM-TAYLOR, 2011). Diferentes grupos de pesquisa sugerem a liberação de citocinas próinflamatórias intraneuralmente após a lesão de nervo como sendo um importante fator na geração de impulsos ectópicos em neurônios nociceptivos lesionados, que resulta no desenvolvimento da dor neuropática (AUSTIN e MOALEM-TAYLOR, 2010; LEE e ZHANG, 20012; JÄNIG e LEVINE, 2013). Corroborando estes dados, no presente estudo verificou-se que após a injeção i.n. da quimiocina CXCL1 os animais apresentaram aumento na sensibilidade ao estímulo mecânico por até 10 dias após a administração. Por outro lado, apesar do decréscimo do limiar mecânico, a administração i.n. da quimiocina CXCL1 induziu hiperalgisia térmica ao calor apenas no terceiro dia após a injeção. De fato, como já descrito na literatura, a hiperalgisia

mecânica e térmica ao calor são respostas mecanisticamente distintas, mediadas através de diferentes fibras aferentes, e que podem envolver circuitos neuronais diversos, tanto espinhais, como supraespinhais (SHIR E SELTZER, 1990; OSSIPOV et al., 1999). A sensibilidade ao estímulo térmico induzida pela injeção i.n. de CXCL1 não foi avaliada nos demais protocolos experimentais, uma vez que esta não apresentou resposta suficientemente robusta como a observada na hiperalgesia mecânica.

Após a padronização do modelo de hiperalgesia de longa duração induzida pela injeção i.n. de CXCL1, foi demonstrado que o tratamento com a gabapentina reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica neste modelo. Este fármaco é reconhecido como sendo bastante eficaz para tratar dor crônica de diferentes origens, sendo amplamente empregado clinicamente para o alívio da dor neuropática (O'CONNOR e DWORKIN, 2009; BEAL et al., 2012). Estes dados sugerem que a injeção i.n. CXCL1 pode ser usada como um modelo experimental reprodutível para o estudo de mecanismos relacionados à transmissão da dor crônica.

Em seguida, com o objetivo de avaliar o possível envolvimento do receptor da CXCL1, o receptor CXCR2, no modelo de dor prolongado induzido por essa quimiocina, foi realizado o tratamento com o antagonista seletivo SB225002 e avaliada a hiperalgesia mecânica associada a este modelo. O tratamento repetido com o antagonista do receptor CXCR2 foi eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pela CXCL1, sugerindo a dependência da ativação deste receptor na fase inicial deste modelo. Diversos estudos na literatura demonstram o envolvimento do receptor CXCR2 em diferentes modelos experimentais de dor (BIZZARRI et al., 2006; CUNHA et al, 2008; MANJAVACHI et al., 2010; CARREIRA et al., 2013; ZHANG et al., 2013; CAO et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Estes estudos baseiam-se no fato de que os neutrófilos participam da modulação dos eventos iniciais da dor inflamatória e durante lesão de nervo em roedores (DAEMEN et al., 1998; PERKINS e TRACEY, 2000; SWEITZER et al., 2002; MORIN et al., 2007; MAROTTA et al., 2009). Após a infiltração de neutrófilos, o segundo tipo celular recrutado são os macrófagos, em resposta às moléculas inflamatórias liberadas anteriormente. Estes dados suportam a idéia de que uma interação neuroimune ocorre como resultado da lesão dos nervos periféricos, sugerindo a importância dessas células para o desenvolvimento subsequente da dor neuropática (PERKINS E

TRACEY, 2000; MOALEN et al., 2004; KUMAR e SHARMA, 2010). Ainda, o recrutamento de neutrófilos parece ser mediada pela liberação de substâncias quimioatraentes, tais como o fator de crescimento de nervo β (NGF- β), leucotrieno-B₄, CCL2 e, em destaque, a quimiocina CXCL1 (JOHNSTON et al., 1999; SCHOLZ e WOOLF, 2007). Sendo assim, nos propusemos a investigar a participação da migração de neutrófilos no modelo de dor prolongada causada pela administração de CXCL1 no nervo ciático de camundongos. Os dados do presente trabalho não confirmam mas estendem os dados da literatura, uma vez que a atividade da enzima MPO foi encontrada aumentada no nervo ciático 1 h após a injeção i.n. da quimiocina, e que a depleção de neutrófilos através do tratamento com vimblastina reduziu acentuadamente a resposta nociceptiva causada pela injeção i.n. de CXCL1. Coletivamente, estes resultados sugerem a dependência da ativação do receptor CXCR2, bem como da subsequente migração de neutrófilos, neste modelo experimental de dor prolongada.

A migração de neutrófilos para os sítios da inflamação pode resultar em aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, bem como contribuir para o estabelecimento do quadro nociceptivo (FERNANDES et al., 2004; MAROTTA et al., 2009; CUNHA et al., 2008). Neste contexto, o próximo passo deste estudo foi avaliar a possível liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias após a administração intraneural de CXCL1 no nervo ciático de camundongos. Existem dados da literatura que suportam o conceito de que as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6, participam ativamente da patogênese da dor neuropática (CUI et al., 2000; MOALEM e TRACEY, 2006; THACKER et al., 2007). No nervo lesionado periférico por exemplo, o nível destes mediadores inflamatórios encontram-se aumentados, o que leva ao quadro de neuroinflamação crônica, resultando no desenvolvimento da dor neuropática (OKAMOTO et al., 2001; SHAMASH et al., 2002). Corroborando estes dados, a injeção i.n. de CXCL1 no nervo ciático resultou na liberação de IL-1 β , IL-6 e CCL2, mas não de TNF- α . Estes resultados apontam o papel relevante exercido pela CXCL1 como um mediador que pode induzir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais, por sua vez, contribuem para a dor prolongada em camundongos.

A participação dos produtos da ciclooxigenase e das catecolaminas na hiperalgesia mecânica induzida pela administração de CXCL1 no nervo ciático foi avaliada pelo tratamento sistêmico com

indometacina e guanetidina, respectivamente. Os prostanóides e as aminas simpáticas são considerados os mediadores finais, responsáveis pela hiperalgesia mecânica em modelos animais de dor inflamatória (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; NAKAMURA e FERREIRA, 1987; KHASAR et al., 1999). Ainda, tem sido descrito que a liberação destes mediadores é geralmente precedida pela liberação de citocinas e quimiocinas (CUNHA et al., 1992; CUNHA e FERREIRA, 2003; CUNHA et al., 2005). Um estudo interessante conduzido por Cunha e colaboradores (2005) sugeriu que a injeção intraplantar de CXCL1 induz hiperalgesia mecânica através da liberação de prostanóides e aminas simpatomiméticas. Porém, em nosso estudo, a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de CXCL1 no nervo ciático parece depender apenas da liberação de prostanóides, uma vez que o tratamento com indometacina (inibidor não seletivo das enzimas COX 1 e 2), mas não com guanetidina (inibidor da liberação de catecolaminas), foi eficaz sobre esta resposta. Portanto, pode-se propor que existem diferenças nos mecanismos farmacológicos de indução de dor entre o presente modelo e o modelo de dor inflamatória proposto previamente por Cunha e colaboradores (2005); estas diferenças podem estar relacionadas as diferentes células que compõe os tecidos subcutâneo e neural, acarretando um perfil diferente de liberação de mediadores pró-nociceptivos.

Um dado importante do presente estudo que merece ser destacado, são os achados de que a quimiocina CXCL1 quando administrada no nervo ciático de camundongos, induz comportamento de dor prolongada. Os efeitos nociceptivos apresentados pela quimiocina, além de serem caracterizados por dor do tipo crônica, também demonstraram estar relacionados com alterações inflamatórias importantes. Estes achados suportam o conceito de que a quimiocina CXCL1 parece exercer um importante papel na patogênese da dor neuropática e pode se tornar alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficazes clinicamente. Visando fortalecer ainda mais esta hipótese, na segunda etapa deste trabalho procurou-se avaliar a possível contribuição desta quimiocina sobre a dor neuropática, utilizando o modelo animal de ligação parcial do nervo ciático, bem como a neuropatia induzida pelo PTX em camundongos.

Como relatado anteriormente, diversos estudos demonstram que as quimiocinas desempenham papel crucial tanto na patogênese de doenças inflamatórias clássicas, como também no desenvolvimento e/ou manutenção da dor neuropática. De maneira geral, estes

mediadores são regulados e liberados por diferentes tipos celulares após a lesão do nervo periférico, provocando a sensibilização periférica (para revisão ver KIGUCHI et al., 2012; JI et al., 2014). Ainda, diversos estudos recentes sugerem a contribuição da quimiocina CXCL1 no desenvolvimento de diferentes tipos de dor. Cunha e colaboradores (2005) por exemplo, avaliaram a participação desta quimiocina no desenvolvimento de dor inflamatória em roedores. Estes autores demonstraram que a injeção intraplantar de CXCL1 induz hiperalgesia mecânica de maneira dose e tempo dependente em camundongos. Além disso, foi relatado que a injeção intraplantar de carragenina induz a liberação de CXCL1 no tecido plantar, e o anticorpo anti-CXCL1 inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (CUNHA et al., 2005). No entanto, a quimiocina CXCL1 parece ser importante não apenas para a dor inflamatória, mas também para a dor neuropática. Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa verificou que o tratamento sistêmico com SB225002, o antagonista seletivo do receptor de CXCL1 (CXCR2), preveniu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC em camundongos (MANJAVACHI et al., 2010a).

Nossos resultados sugerem a participação da quimiocina CXCL1 nas respostas do tipo dor neuropática causadas pela LPNC em camundongos, uma vez que ocorre uma regulação positiva desta quimiocina em tecidos relacionadas com o processamento da dor. A análise molecular do RNAm para a CXCL1 demonstrou aumento deste transcrito no nervo ciático e medula espinal após a cirurgia de LPNC. Além disso, os resultados do presente estudo também demonstraram que a LPNC induz o aumento acentuado nos níveis desta quimiocina nos mesmos tecidos avaliados. Estes resultados corroboram dados da literatura os quais demonstram a regulação positiva de uma outra quimiocina, a CCL2, em várias estruturas do sistema nervoso periférico e central em diferentes modelos de neuropatia em roedores. A CCL2 é bem estabelecida por desempenhar um importante papel no desenvolvimento da dor neuropática em roedores (TOEWS et al., 1998; ABBADIE et al., 2003; TANAKA et al., 2004). Toews e colaboradores (1998) verificaram o aumento do RNAm para a quimiocina CCL2 em neurônios sensoriais primários 48 h após a lesão do nervo ciático. De maneira semelhante, a quimiocina CCL2 e seu receptor CCR2 tiveram seus níveis aumentados não apenas no local de lesão do nervo, mas também em estruturas como o GRD e a medula espinal (ABBADIE et

al., 2003; TANAKA et al., 2004). Estes resultados, em conjunto com outros estudos farmacológicos, atestam a importância da liberação CCL2 no estabelecimento e na manutenção da dor neuropática em modelos animais, e reforçam a hipótese de que outras quimiocinas, como a CXCL1, também possam desempenhar um papel semelhante na manutenção da dor em modelos animais, possivelmente por atrair células inflamatórias para estruturas relacionadas a transmissão da dor, contribuindo para a neuroinflamação periférica e/ou central.

Já está bem estabelecido na literatura, que após a lesão periférica de nervo, ocorre uma rápida resposta inflamatória tanto no local do dano, como na medula espinhal, que contribui para o desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva (WHITE et al., 2005; HU et al., 2007; ELLIS e BENNETT, 2013; JI et al., 2014). As primeiras células a reagirem à lesão nervosa são as células de Schwann seguida pelas células imunes residentes responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios que podem sensibilizar os nociceptores, ou ainda recrutar neutrófilos, as primeiras células a infiltrarem o tecido lesionado (PERKINS e TRACEY, 2000; ZUO et al., 2003; KIM e MOALEM-TAYLOR, 2011). Esta proposição é sustentada pelo fato de que diferentes trabalhos da literatura relatam que a infiltração de neutrófilos no local de lesão do nervo ocorre de maneira aguda, com aumento nas primeiras horas após a lesão e declina após 3 dias em modelos experimentais de lesão de nervo (CLATWORTHY et al., 1995; PERKINS e TRACEY, 2000; ZUO et al., 2003). De maneira semelhante a estes dados da literatura, nossos resultados evidenciam aumento da atividade da enzima MPO, medida indireta da migração de neutrófilos, até 4 dias na periferia e 10 dias na medula espinhal após a LPNC. É importante destacar que este evento ocorre em paralelo ao aumento dos níveis da quimiocina CXCL1 e do seu RNAm nestas mesmas estruturas, sugerindo uma íntima relação entre estes eventos.

Ainda, a fim de validar a contribuição da migração de neutrófilos para a resposta hiperalgésica induzida pela LPNC, animais que tiveram esta população de células inflamatórias depletada apresentaram redução da hiperalgesia mecânica o que confirma a dependência da migração de neutrófilos neste modelo. De maneira semelhante, um estudo prévio demonstrou que o tratamento com o anticorpo anti-neutrófilo no momento da lesão, com o objetivo de esgotar neutrófilos circulantes, foi eficaz em reduzir a

hipersensibilidade mecânica de ratos, embora a depleção de neutrófilos circulantes não tenha reduzido a hiperalgesia após sua instalação, ou seja, quando realizada no oitavo dia após a lesão (PERKINS e TRACEY, 2000). Coletivamente, estes resultados apoiam a noção de que a interação neuroimune que ocorre como resultado de uma lesão de nervos periféricos é importante para o desenvolvimento da dor neuropática. Ademais, nossos resultados sugerem a possível contribuição da quimiocina CXCL1 para este evento, possivelmente por estimular a migração de células inflamatórias para estruturas periféricas e centrais envolvidas com o processamento da dor.

O próximo objetivo do nosso estudo foi verificar a possível contribuição periférica da quimiocina CXCL1 no desenvolvimento e na manutenção das respostas nociceptivas induzidas pela LPNC através da administração sistêmica e local do anticorpo anti-CXCL1. Estes experimentos demonstraram que a quimiocina CXCL1 parece estar implicada no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica ou térmica ao calor, uma vez que animais tratados sistemicamente com o anticorpo anti-CXCL1 no momento da cirurgia tiveram suas respostas hiperalgésicas reduzidas até o sétimo e quinto dia, respectivamente, após a LPNC. Esta proposição é sustentada pelos resultados apresentados nos experimentos bioquímicos e de biologia molecular, acima descritos, demonstram claramente que ocorre aumento na regulação da quimiocina CXCL1 poucas horas após a lesão do nervo ciático. Embora não se possa afirmar que os efeitos sistêmicos do anticorpo anti-CXCL1 sejam periféricos, acreditamos que este anticorpo não atravesse a barreira hemato encefálica (BHE) devido seu alto peso molecular; portanto, seus efeitos antinociceptivos ocorrem possivelmente por ação na periferia. Para confirmar tal hipótese avaliamos o efeito local do anti-corpo anti-CXCL1 no modelo de LPNC. Corroborando os resultados sistêmicos, a administração do anticorpo anti-CXCL1 no local da lesão, imediatamente após a cirurgia, reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica (ao calor) causadas pela LPNC, confirmando a possível participação da liberação desta quimiocina neste modelo de dor neuropática. Apesar da sua eficácia sobre o desenvolvimento das respostas hiperalgésicas induzidas pela LPNC, o anticorpo anti-CXCL1 apresentou efeito anti-nociceptivo menos pronunciado sobre a hiperalgesia instalada, isto é, quando foi administrado como tratamento único 4 dias após a lesão do nervo. Estes resultados são, portanto, consistentes com outros trabalhos descritos na

literatura que relatam a participação de outras quimiocinas, tais como CCL2, CX3CL1 e CCL21, nas fases iniciais do estabelecimento da dor neuropática (ABBADIE, et al., 2003; VERGE et al., 2004; ZHUANG et al., 2007; GAO et al., 2009; BIBER et al., 2011). Vale destacar que os efeitos do anti-corpo anti-CXCL1 sobre a LPNC são semelhantes aos da depleção de neutrófilos neste mesmo modelo, reforçando a relação entre o aumento de CXCL1 a migração de neutrófilos para estruturas de transmissão da dor.

Tendo demonstrado que a quimiocina CXCL1 periférica parece contribuir para a neuropatia induzida pela LPNC, avaliou-se o efeito do tratamento i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 sobre a hiperalgesia mecânica, a fim de verificar o possível envolvimento de vias centrais nas ações desta quimiocina no presente modelo, especialmente porque a lesão do nervo elevou os níveis espinhais de CXCL1 e de seu RNAm. De modo relevante, ambos tratamentos i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 no momento ou 4 dias após a cirurgia reduziram acentuadamente a hiperalgesia mecânica, sugerindo que a quimiocina CXCL1 liberada na medula espinhal medeia esta resposta. De fato, estudos prévios reportaram a expressão de CXCL1 e seu receptor CXCR2 na medula espinhal (MENNICKEN et al, 1999; CARTIER et al., 2005; MINES et al., 2007). Estes últimos resultados mostraram-se promissores no que diz respeito a participação central da quimiocina CXCL1 na patogênese da dor neuropática. De fato, um estudo recente, concomitante ao nosso, demonstrou pela primeira vez a relação desta quimiocina, bem como do seu receptor CXCR2, na regulação da atividade do sistema imune central em modelos animais de dor neuropática (ZHANG et al., 2013). Zhang e colaboradores (2013) reportaram que o modelo de ligação de nervo espinhal induz aumento da expressão da quimiocina CXCL1 em astrócitos de camundongos. Além disso, assim como os nossos resultados, a administração i.t. do anticorpo anti-CXCL1 reduziu de maneira significativa a hipersensibilidade induzida pela ligação de nervo, sugerindo um papel fundamental na sensibilização da quimiocina CXCL1 na dor neuropática. Ainda, foi demonstrado que a administração i.t. desta quimiocina não só induziu hiperalgesia mecânica, mas também induziu uma rápida ativação neuronal, indicada pela expressão aumentada da proteína quinase ERK, CREB, e c-Fos em neurônios da medula espinhal. De maneira interessante, o receptor CXCR2 também teve sua expressão aumentada em neurônios do corno dorsal da medula espinhal após a cirurgia de ligação de nervo espinhal,

e o bloqueio farmacológico deste receptor reduziu a hiperalgesia induzida pela administração i.t. da quimiona CXCL1. Em conjunto, estes dados sugerem que a sinalização entre CXCL1-CXCR2 medeia as interações entre astrócitos e neurônios da medula espinhal, e parece ter um papel importante no desenvolvimento e na manutenção da dor neuropática, confirmando assim a nossa idéia inicial de que a quimiocina CXCL1 e o seu receptor possam ser candidatos promissores para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas destinada ao tratamento de neuropatias humanas.

Com o intuito de melhor entender a participação da neuroinflamação como um fator crucial no desenvolvimento e na manutenção da dor neuropática, o próximo objetivo do presente estudo foi avaliar a possível contribuição da quimiocina CXCL1 para a liberação de citocinas pró-inflamatórias após a LPNC. Nossos resultados demonstram que a LPNC induziu aumento significativo da concentração de todas as citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-6, CCL2 e TNF- α). Estes resultados são consistentes com estudos apresentados na literatura, pois já é bem documentado a liberação destes mediadores inflamatórios após a lesão de nervo (para revisão ver AUSTIN e MOALEM-TAYLOR, 2010). A citocina TNF- α , é considerada um importante mediador inflamatório tendo inclusive a capacidade de induzir uma cascata de produção de citocinas, e tem sido associada com ambas as fases de desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Logo após a lesão de nervos periféricos está bem estabelecido que ocorre a liberação de TNF- α a partir de células de Schwann, macrófagos e mastócitos residentes (GEORGE et al., 1999; SHUBAYEV e MYERS, 2000; SHAMASH et al., 2002). Assim como o TNF- α , as demais citocinas avaliadas no presente estudo também foram relatadas por serem liberadas em modelos animais de lesão de nervo (ITO et al., 1998; SHAMASH et al., 2002; ABBADIE et al., 2003; MA e QUIRION, 2005). Em nosso estudo, camundongos tratados com o anticorpo anti-CXCL1 logo após a cirurgia tiveram os níveis de IL-1 β e de IL-6 reduzidos no local da lesão. Entretanto, os níveis teciduais da citocina CCL2 e TNF- α não foram alterados após o tratamento com o anticorpo anti-CXCL1. Estes dados estão de acordo com os resultados da administração i.n. de CXCL1, onde foi observado aumento de IL-1 β e IL-6, mas não de TNF- α , após injeção da quimiocina no nervo ciático. No entanto, no modelo de LPNC o aumento nos níveis de CCL2 parece não ser mediado pela liberação de

CXCL1, sugerindo ação independente destas quimiocinas na dor neuropática. Coletivamente, estes achados sugerem a importância da quimiocina CXCL1 na neuroinflamação induzida por lesão de nervo, e pode-se propor que o controle das interações neuroimunes iniciais, como o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias (tais como CXCL1, CCL2, IL-1 β e IL-6) através por exemplo, da ação de mediadores antiinflamatórias (tais como as citocinas IL-10, IL-4, o TGF- α) possam se tornar alvo no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o controle da dor neuropática causada por lesão nervosa.

Na última etapa deste trabalho procurou-se avaliar se os resultados acerca da participação da quimiocina CXCL1 nos dois modelos descritos anteriormente estenderiam-se para outro modelo experimental de dor neuropática que não fosse dependente da lesão direta de nervos. Com essa finalidade, foi utilizado o modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPQP) em camundongos. Além disso, este estudo foi motivado por fatores adicionais, como: i) aumento das estimativas mundiais de incidência de câncer; ii) limitação no uso de certos quimioterápicos pela ocorrência de neuropatia periférica, dificultando o tratamento do câncer; iii) aumento nas taxas de sobrevivência ao câncer e, conseqüentemente, das sequelas causadas pela quimioterapia, como a dor crônica; e iv) o PTX é eficaz contra alguns dos cânceres mais comuns na população mundial, como o câncer de próstata, mama, ovário e pulmão de células não pequenas (THURSTON, 2006; para revisão ver HAN e SMITH, 2013).

O sistema nervoso periférico é vulnerável à ação tóxica de várias drogas, uma vez que é desprovido de barreira hematoencefálica. Assim, a toxicidade induzida pelos quimioterápicos pode causar danos aos neurônios sensoriais periféricos, especialmente por afetarem seus corpos celulares localizados nos GRD. Estes danos podem causar a perda de fibras sensoriais (evidenciada por degeneração das terminações nervosas), influenciando a atividade das fibras remanescentes (OCEAN e VAHDAT, 2004; BALAYSSAC et al., 2011; HAN e SMITH, 2013). Alguns mecanismos têm sido propostos como responsáveis pelo dano neuronal causado pela quimioterapia, sendo que a disfunção mitocondrial, seguida por estresse oxidativo, talvez seja o principal mecanismo para muitos quimioterápicos (FLATTERS e BENNETT, 2006; PODRATZ et al., 2011; XIAO et al., 2011; ZHENG et al., 2012). No entanto, outros mecanismos parecem estar envolvidos

no desenvolvimento de NPIQ, entre eles a liberação de mediadores inflamatórios, como as proteases, IL-1 β , IL-6, TNF- α , e óxido nítrico, por células não neuronais entre elas células de Langerhans, macrófagos e microglia (para revisão ver JAGGI e SINGH, 2012).

A produção de mediadores inflamatórios é um evento comum a muitas condições de dor crônica, entre elas a dor neuropática, especialmente a causada por lesão de nervos, como descrito anteriormente. Utilizando-se o modelo de neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina, Siau e colaboradores (2006) verificaram aumento no número de células de Langerhans na epiderme de roedores, as quais liberaram mediadores com óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotróficos, os quais podem sensibilizar/ativar os neurônios sensoriais remanescentes. A produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos no GRD de roedores também foi reportada para o modelo do PTX (LEDEBOER et al., 2007). Corroborando estes dados, no presente estudo verificou-se que o tratamento sistêmico com PTX aumentou a expressão de RNAm para a quimiocina CXCL1, bem como seus níveis teciduais em estruturas envolvidas na transmissão do estímulo nociceptivo (GRD e medula espinhal).

Após a caracterização a respeito da liberação da quimiocina CXCL1 no modelo de neuropatia induzida pelo PTX, o próximo passo deste estudo foi avaliar a eficácia do anticorpo anti-CXCL1 e do antagonista do receptor CXCR2 sobre o desenvolvimento e a manutenção das respostas hiperalgésicas. Estes experimentos demonstraram que a quimiocina CXCL1 parece não implicar no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia mecânica, uma vez que animais tratados preventivamente com o anticorpo anti-CXCL1 tiveram suas respostas hiperalgésicas reestabelecidas após apenas 1 dia do último tratamento, bem como a administração sistêmica do anticorpo reduziu a hiperalgesia instalada apenas 1 h após o tratamento. Estes dados conflitam com alguns resultados prévios, obtidos no modelo de LPNC, os quais sugerem que a CXCL1 exerce papel relevante para a indução da hiperalgesia mecânica. Esta discrepância pode refletir possíveis diferenças nos mecanismos patofisiológicos envolvidos nos modelos de neuropatia induzidos por lesão ou por quimioterapia. Ainda, nossos resultados demonstram que o receptor CXCR2 periférico parece não participar dos mecanismos envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Vale ressaltar, que a sensibilidade ao estímulo

térmico não foi avaliada, uma vez que o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor não foi reproduzido em todos os experimentos conduzidos em camundongos da linhagem *Swiss*, apesar da boa reprodutibilidade da hiperalgesia mecânica (indução em ~90% dos animais). De fato, o desenvolvimento da hiperalgesia térmica pelo tratamento com PTX é um achado variável entre os estudos, de modo que tem sido reportado hiperalgesia térmica, hipoalgesia térmica ou ausência de alteração do limar térmico (CAVALETTI et al., 1995; CAMPANA et al., 1998; CLIFFER et al., 1998). Portanto, para evitar o uso desnecessário de animais, em virtude da baixa reprodutibilidade dos experimentos, decidiu-se por não avaliar a sensibilidade ao estímulo térmico nesta etapa do estudo.

Tendo em vista que a liberação periférica da quimiocina CXCL1, bem como o seu receptor periférico parecem não contribuir para a neuropatia induzida pelo PTX, avaliou-se o efeito do tratamento i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 e o antagonista seletivo do receptor CXCR2 sobre a hiperalgesia mecânica, a fim de verificar o possível envolvimento central destes no presente modelo. De modo relevante, o tratamento i.t. com o anticorpo anti-CXCL1 e/ou com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica, sugerindo a participação da CXCL1 e do seu receptor expressos na medula espinhal sobre o estabelecimento desta resposta. De fato, estudos prévios reportaram a funcionalidade desta quimiocina e do seu receptor na medula espinhal (MENNICKEN et al., 1999; CARTIER et al., 2005; MINES et al., 2007; ZHANG et al., 2013). Ademais, dados da literatura também sugerem o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios, produzidos por células da glia na medula espinhal, no modelo da neuropatia induzida pelo PTX ou vincristina (JAGGI e SINGH, 2012). Em um estudo recente, Ochi-ishi e colaboradores (2014) relataram a liberação da quimiocina CCL3 por microglias na medula espinhal após o tratamento com o PTX em ratos. Ainda, foi demonstrado que a administração intratecal do anticorpo anti-CCL3 inibe não somente o desenvolvimento mas também a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pelo quimioterápico (OCHI-ISHI et al., 2014). Estes resultados em conjunto sugerem claramente que a ativação glial, adicionada a subsequente liberação de mediadores inflamatórios na medula espinhal, como um novo mecanismo subjacente à patogênese da neuropatia sensorial periférica induzida por quimioterápicos.

O próximo objetivo do presente estudo foi avaliar se a ativação das principais vias de sinalização do receptor CXCR2 também estaria envolvida na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX. Embora os receptores para quimiocinas possam, por vezes, interagir com as proteínas Gs e Gq, o receptor CXCR2 é geralmente acoplado à proteína Gi, sendo as subunidades α e $\beta\gamma$ as responsáveis por inibirem ou ativar as vias intracelulares (BAJETTO et al., 2002; HETZER et al., 2013). A estimulação do receptor CXCR2 promove rápida ativação da enzima PLC e, conseqüentemente, à produção de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Por sua vez, o IP3 induz a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e o DAG estimula a PKC as quais fosforilam proteínas importantes para as funções celulares, incluindo o efeito nociceptivos (WU et al., 1993; RICHARDSON et al., 1998). Ainda, através da subunidade $\beta\gamma$, pode-se estimular diretamente a enzima PI3K com conseqüente formação fosfatidil-inositol (PIP3) e ativação de Akt, considerada uma das principais vias de sinalização do receptor CXCR2 (KNALL et al., 1997; BAJETTO et al., 2002; WAUGH e WILSON, 2008). No presente estudo, verificou-se que a sensibilização mecânica causado pelo PTX parece envolver a ativação central da enzima PI3K, em especial a isoforma PI3K γ , mas não a enzima PLC e PKC, uma vez que o inibidores seletivos para PI3K (Wortmannin) e PIK γ (AS605240), mas não para PLC (U73122) e PKC (GF109203X) foram eficazes sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo quimioterápico.

Coletivamente, os experimentos comportamentais e moleculares apresentados neste estudo, indicam que a quimiocina CXCL1 contribui para as respostas hiperalgésicas (aos estímulos mecânico e térmico) associadas a diferentes modelos experimentais de neuropatia periférica em camundongos. Foi demonstrado que a quimiocina CXCL1 quando administrada no nervo ciático de camundongos pode induzir hiperalgesia de longa duração dependente da migração de neutrófilos, e da liberação de citocinas pró-inflamatórias e de prostanóides. Ainda, a liberação periférica ou na medula espinhal desta quimiocina após a lesão do nervo ciático parece estar envolvida no estabelecimento da dor neuropática. Os presentes resultados sugerem também que a liberação da CXCL1 na medula espinhal, bem como a ativação do receptor CXCR2 contribuem para o desenvolvimento das respostas hiperalgésicas mecânicas associadas ao modelo de neuropatia periférica induzida pelo PTX.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo estendem substancialmente as informações disponíveis na literatura e suportam o conceito de que a quimiocina CXCL1 e seu receptor CXCR2 participam do estabelecimento da neuroinflamação responsável pela indução e manutenção da dor crônica. Considerando que a terapia atual ainda não é adequada para tratar dores crônicas, os alvos investigados neste estudo podem representar valiosas estratégias farmacológicas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da dor neuropática. De fato, evidências atuais sugerem fortemente um papel importante exercido pelas quimiocinas no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, através principalmente das interações entre neurônios e células da glia. Nos últimos anos foram desenvolvidos diferentes inibidores de quimiocinas ou de receptores de quimiocinas, incluindo anticorpos monoclonais, inibidores anti-sense, e antagonistas (MINES et al., 2007). Portanto, estudos clínicos controlados são necessários para investigar a sugerida eficácia destes compostos sobre a dor neuropática.

6 – SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- A injeção i.n. de CXCL1 no nervo ciático causou aumento significativo da sensibilidade ao estímulo mecânico, o qual foi mediado pelo receptor CXCR2. A injeção i.n. CXCL1 pode ser usada como um modelo experimental para estudo de mecanismos relacionados à transmissão da dor crônica;
- A hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.n. de CXCL1 parece depender da migração de neutrófilos, uma vez que foi acompanhada de aumento na atividade da enzima MPO no nervo ciático, e a depleção prévia de neutrófilos com vimblastina reduziu a resposta hiperalgésica;
- A administração i.n. de CXCL1 induziu a liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e CCL2) no nervo ciático de camundongos, sugerindo o envolvimento destes mediadores na resposta hiperalgésica. Ainda, a hiperalgesia mecânica induzida pela administração i.n. de CXCL1 parece depender também da liberação de prostanoídes, mas não da liberação de aminas simpatomiméticas;
- A LPNC aumentou os níveis de CXCL1 e de seu RNAm no nervo ciático e medula espinhal de camundongos, sugerindo o envolvimento periférico e/ou central da quimiocina nas respostas hiperalgésicas deste modelo. De fato, a injeção sistêmica (ou local) de anticorpo anti-CXCL1 e o tratamento i.t. com o anticorpo reduziu ambas as fases de indução e de manutenção da dor neuropática após a LPNC;
- A liberação de CXCL1 após a LPNC parece contribuir para as respostas hiperalgésicas por estimular a migração de neutrófilos para o nervo lesado e para a medula espinhal, uma vez que o aumento de neutrófilos nestes tecidos correlacionou-se com o aumento nos níveis de CXCL1, e a depleção prévia de neutrófilos reduziu a hiperalgesia mecânica de modo semelhante ao tratamento com o anticorpo anti-CXCL1;

- O envolvimento da quimiocina CXCL1 no modelo de LPNC depende também da liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias, já que o tratamento com o anticorpo anti-CXCL1 reduziu os níveis teciduais de IL-1 β e IL-6, mas não de TNF- α e CCL2;
- O tratamento prolongado de PTX induziu aumento significativo da CXCL1 e do seu RNAm no GRD e medula espinhal, sugerindo o envolvimento periférico e/ou central da quimiocina nas respostas hiperalgésicas deste modelo;
- O tratamento sistêmico com o anticorpo anti-CXCL1, mas não o com antagonista do receptor CXCR2, reduziu transitoriamente a hiperalgesia mecânica instalada pelo PTX, bem como retardou o seu desenvolvimento (tratamento preventivo). Estes resultados sugerem que a liberação periférica de CXCL1 contribui para as fases de indução e manutenção da neuropatia induzida pelo PTX;
- Os tratamentos com o anti-CXCL1 ou com o antagonista do CXCR2, quando administrados pela via i.t., inibiram sutilmente a hiperalgesia mecânica estabelecida pelo PTX, bem como atrasaram significativamente seu estabelecimento (tratamento preventivo). Estes resultados sugerem a participação da quimiocina CXCL1 e do seu receptor, expressos na medula espinhal, na manutenção e desenvolvimento da neuropatia induzida pelo PTX;
- Os mecanismos centrais envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida pelo PTX parecem depender da ativação da via de sinalização PI3K/AKT, e não das enzimas PLC e PKC, sugerindo uma relação com alguns dos mecanismos intracelulares mediados por CXCR2;
- Em conjunto, os resultados do presente estudo sustentam a ideia de que a quimiocina CXCL1 exerce um importante papel no desenvolvimento da dor neuropática em diferentes modelos experimentais. Desta maneira, os alvos investigados neste estudo podem representar valiosas estratégias farmacológicas para o

desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da dor neuropática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADIE, C.; LINDIA, J.A.; CUMISKEY, A.M.; PETERSON, L.B.; MUDGETT, J.S.; BAYNE, E.K.; DEMARTINO, J.A.; MACINTYRE, D.E.; FORREST, M.J. **Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7947-7952, 2003.
- ABBADIE, C. **Chemokines, chemokine receptors and pain**. *Trends Immunol* 26: 529-534, 2005.
- ABBADIE, C.; BHANGOO, S.; DE KONINCK, Y.; MALCANGIO, M.; MELIK-PARSADANIAN, S.; WHITE, F.A. **Chemokines and pain mechanisms**. *Brain Res Rev* 60: 125-134, 2009.
- AHUJA, S.K.; MURPHY, P.M. **The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor**. *J. Biol. Chem.* 271: 20545-20550, 1996.
- ALEY, K.O.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. **Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans**. *Neuroscience* 73:259-265, 1996.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review**. *Brain Res* 1000: 40-56, 2004.
- ARRUDA, J.L.; COLBURN, R.W.; RICKMAN, A.J.; RUTKOWSKI, M.D.; DELEO, J.A. **Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain**. *Brain Res Mol Brain Res* 62: 228-235, 1998.
- ASENSIO, V.C.; CAMPBELL, I.L. **Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states**. *Trends Neurosci* 22: 504-512, 1999.
- ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. **Management of chronic pain**. *Lancet* 353:1865-1869, 1999.
- AUSTIN, P.J.; MOALEM-TAYLOR, G. **The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines**. *J. Neuroimmunol.* 229: 26-50, 2010.
- BACKONJA, M.M.; STACEY, B. **Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating**. *J. Pain* 5: 491-497, 2004.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. **Human chemokines: an update**. *Annu Rev Immunol.* 15: 675-705, 1997.
- BAJETTO, A.; BONAVALIA, R.; BARBERO, S.; SCHETTINI, G. **Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications**. *J Neurochem.* 82(6):1311-29, 2002.
- BALAYSSAC, D.; FERRIER, J.; DESCOEUR, J.; LING, B.; PEZET, D.; ESCHALIER, A.; AUTHIER, N. **Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence**. *Expert Opin. Drug Saf.* 10: 407-417, 2011.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. **Cellular and Molecular Mechanisms of Pain**. *Cell* 139: 269-284, 2009.

- BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. **The perception of pain.** In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. *The principles of Neural Science.* McGraw-Hill: Nova Iorque, 2000, 4ed.: 472-791.
- BEAL, B.; MOELLER-BERTRAM, T.; SCHILLING, J.M.; WALLACE, M.S. **Gabapentin for once-daily treatment of post-herpetic neuralgia: a review.** Clin. Interv. Aging 7: 249-255, 2012.
- BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. **A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man.** Pain 33:87-107, 1988.
- BENTO, A.F.; LEITE, D.F.; CLAUDINO, R.F.; HARA, D.B.; LEAL, P.C.; CALIXTO, J.B. **The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice.** J. Leukoc. Biol. 84: 1213-1221, 2008.
- BESSON, J.M. **The neurobiology of pain.** Lancet 353:1610-1615, 1999.
- BIBER, K.; TSUDA, M.; TOZAKI-SAITOH, H.; TSUKAMOTO, K.; TOYOMITSU, E.; MASUDA, T.; BODDEKE, H.; INOUE, K. **Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development.** EMBO J 30:1864-73, 2011.
- BIZZARRI, C.; BECCARI, A.R.; BERTINI, R.; CAVICCHIA, M.R.; GIORGINI, S.; ALLEGRETTI, M. **ELR β CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets.** Pharmacol.Ther. 112: 139-149, 2006.
- BORTOLANZA, L.B.; FERREIRA, J.; HESS, S.C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. **Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice.** Eur. J. Pharmacol. 453: 203-208, 2002.
- BOZIC, C.R.; Gerard, N.P.; von Uexkull-Guldenband, C.; Kolakowski, L.F. Jr; Conklyn, M.J.; Breslow, R.; Showell, H.J.; Gerard, C. **The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization.** J BiolChem 269: 29355-29358, 1994.
- BURGESS, G.; WILLIAMS, D. **The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities.** J. Clin. Invest. 120: 3753-3759, 2010.
- CAMPANA, W.M.; ESKELAND, N.; CALCUTT, N.A.; MISASI, R.; MYERS, R.R.; O'BRIEN JS. **Prosaptide prevents paclitaxel neurotoxicity.** Neurotoxicology. 19: 237-44, 1998.
- CAMPS, M.; RÜCKLE, T.; JI, H.; ARDISSONE, V.; RINTELEN, F.; SHAW, J.; FERRANDI, C.; CHABERT, C.; GILLIERON, C.; FRANÇON, B.; MARTIN, T.; GRETERER, D.; PERRIN, D.; LEROY, D.; VITTE, P.A.; HIRSCH, E.; WYMAN, M.P.; CIRILLO, R.; SCHWARZ, M.K.; ROMMEL, C. **Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis.** Nat Med 11:936-943, 2005.
- CAO, D.L.; ZHANG, Z.J.; XIE, R.G.; JIANG, B.C.; JI, R.R.; GAO, Y.J. **Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2.** Exp Neurol 261:328-336, 2014.

- CARLSON, K.; OCEAN, A.J. **Peripheral neuropathy with microtubule-targeting agents: occurrence and management approach.** Clin.Breast.Cancer 11: 73-81, 2011.
- CARREIRA, E.U.; CARREGARO, V.; TEIXEIRA, M.M.; MORICONI, A.; ARAMINI, A.; VERRI, W.A.J.R.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; CUNHA, T.M. **Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain.** Eur J Pain. 17:654-663, 2013.
- CARTIER, L.; HARTLEY, O.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; KRAUSE, K.H. **Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases.** Brain Res Brain Res Rev 48:16– 42, 2005.
- CAVALETTI, G.; TREDICI, G.; BRAGA, M.; TAZZARI S. **Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol.** Exp. Neurol. 133: 64-72, 1995.
- CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.** N Engl J Med. 354: 610-621, 2006.
- CLATWORTHY, A.L., ILLICH, P.A., CASTRO, G.A., WALTERS, E.T. **Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain.** Neurosci. Lett. 184, 5–8, 1995.
- CLIFFER, K.D.; SIUCIAK, J.A.; CARSON, S.R.; RADLEY, H.E.; PARK, J.S.; LEWIS, D.R.; ZLOTCHENKO E. **Physiological characterization of Taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat.** Ann. Neurol. 43: 46-55, 1998.
- CONCEA – CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. 2013. Disponível em: http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=20 Acesso em: 20 de julho de 2015.
- COSTA, R.; MOTTA, E.M.; DUTRA, R.C.; MANJAVACHI, M.N.; BENTO, A.F.; MALINSKY, F.R.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, JB. **Anti-nociceptive effect of kinin B₁ and B₂ receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice.** Br J Pharmacol 164:681-93, 2011.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOLFF, C.J. **Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage.** Annu Rev Neurosci 32: 1-32, 2009.
- COULL, J.A.; BEGGS, S.; BOUDREAU, D.; BOIVIN, D.; TSUDA, M.; INOUE, K.; GRAVEL, C.; SALTER, M.W.; DE KONINCK, Y. **BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.** Nature 438: 1017-1021, 2005.
- COURTEIX, C.; ESCHALIER, A.; LAVARENNE, J. **Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain.** Pain 53:81-88, 1993.
- CRAIG, A.D. **Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing.** Annu Rev Neurosci 26:1-30, 2003.

- CUI, J.G.; HOLMIN, S.; MATHIESEN, T.; MEYERSON, B.A.; LINDEROTH, B. **Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy.** *Pain* 88: 239-248, 2000.
- CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. **Peripheral hyperalgesic cytokines.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 521:22-39, 2003.
- CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. **Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain.** *Br. J. Pharmacol.* 104: 765-767, 1991.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. **The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia.** *Br. J. Pharmacol.* 107: 660-664, 1992.
- CUNHA, T.M.; VERRI JR., W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. **A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 1755-1760, 2005.
- CUNHA, T.M.; VERRI JR., W.A.; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. **Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception.** *J. Leukoc. Biol.* 83: 824-832, 2008.
- CURNOCK, A.P.; LOGAN, M.K.; WARD, S.G. **Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases.** *Immunology* 105:125-136, 2002.
- DAEMEN, M.A.; KURVERS, H.A.; KITSLAAR, P.J.; SLAAF, D.W.; BULLENS, P.H.; VAN DEN WILDENBERG, F.A. **Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain.** *Neurol. Res.* 20: 41-45, 1998.
- DECOSTERD, I.; WOOLF, C.J. **Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.** *Pain* 87:149-158, 2000.
- DUBNER, R.; REN, K. Endogenous mechanisms of sensory modulation. *Pain* 6:S45-53, 1999.
- DWORKIN, R.H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M.C.; ALLEN, R.R.; ARGOFF, C.R.; BENNETT, G.J.; BUSHNELL, M.C.; FARRAR, J.T.; GALER, B.S.; HAYTHORNTHWAITHE, J.A.; HEWITT, D.J.; LOESER, J.D.; MAX, M.B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K.E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D.C.; WALLACE, M.S.; WATKINS, L.R.; WEINSTEIN, S.M. **Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations.** *Arch Neurol* 60: 1524-1534, 2003.
- ELLIS, A.; BENNETT, D.L. **Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain.** *Br J Anaesth* 111:26-37, 2013.
- FARRAR, J.T. **Advances in clinical research methodology for pain clinical trials.** *Nat Medicine* 16:1284-1293, 2010.
- FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; CAMPOS, M.M.; DE SOUZA, G.E.; FITTIPALDI, J.F.; PESQUERO, J.L.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B. **Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression.** *Br. J. Pharmacol.* 146: 209-216, 2004.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. **I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process.** *Prostaglandins* 18:179-90, 1979.

- FLATTERS, S.J.; BENNETT, G.J. **Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction.** *Pain* 122: 245-57, 2006.
- GAO, Y.J.; JI, R.R. **Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain.** *Pharmacology & Therapeutics* 126: 56-68, 2010.
- GAO, Y.J.; ZHANG, L.; SAMAD, O.A.; SUTER, M.R.; YASUHIKO, K.; XU, Z.Z.; PARK, J.Y.; LIND, A.L.; MA, Q.; JI, R.R. **JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain.** *J. Neurosci* 29:4096–4108, 2009.
- GEORGE, A.; SCHMIDT, C.; WEISHAUP, A.; TOYKA, K.V.; SOMMER, C. **Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury.** *Exp Neurol* 160:124-132, 1999.
- GERARD, C.; ROLLINS, B.J. **Chemokines and disease.** *Nat immunol.* 2: 106-115, 2001.
- GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. **Nociceptor sensitization in pain pathogenesis.** *Nat Medicine* 16:1248-1257, 2010.
- GOMEZ-NICOLA, D.; VALLE-ARGOS, B.; SUARDIAZ, M.; TAYLOR, J.S.; NIETO-SAMPEDRO, M. **Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration.** *J. Neurochem.* 107:1741–1752, 2008.
- GUO, W.; WANG, H.; WATANABE, M.; SHIMIZU, K.; ZOU, S.; LAGRAIZE, S.C.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. **Glial–cytokine–neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain.** *J Neurosci* 27: 6006-6018, 2007.
- HALL, G.C.; CARROLL, D.; PARRY, D.; MCQUAY, H.J. **Epidemiology and treatment of neuropathic pain: the UK primary care perspective.** *Pain* 122: 156-162, 2006.
- HAN, Y.; SMITH, M.T. **Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN).** *Front Pharmacol.* 4:1-16, 2013.
- HANANI, M.; HUANG, T.Y.; CHERKAS, P.S.; LEDDA, M.; PANNESSE, E. **Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage.** *Neuroscience* 114: 279-283, 2002.
- HANSSON, P.T.; DICKENSON, A.H. **Pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain conditions based on shared commonalities despite multiple etiologies.** *Pain* 113:251-4, 2005.
- HERTZER, K.M.; DONALD, G.W.; HINES, O.J. **CXCR2: a target for pancreatic cancer treatment?** *Expert Opin Ther Targets.* 17(6):667-80, 2013.
- HOLMES, F.E.; ARNOTT, N.; VANDERPLANK, P.; KERR, N.C.; LONGBRAKE, E.E.; POPOVICH, P.G.; IMAI, T.; COMBADIÈRE, C.; MURPHY, P.M.; WYNICK, D. **Intra-neural administration of fractalkine attenuates neuropathic pain-related behaviour.** *J. Neurochem.* 106:640–649, 2008.

- HONORE, P.; ROGERS, S.D.; SCHWEI, M.J.; SALAK-JOHNSON, J.L.; LUGER, N.M.; SABINO, M.C.; CLOHISY, D.R.; MANTYH, P.W. **Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons.** Neuroscience 98:585-598, 2000.
- HU, P.; BEMBRICK, A.L.; KEAY, K.A.; MCLACHLAN, E.M. **Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve.** Brain Behav. Immun. 21: 599-616, 2007.
- HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. **The molecular dynamics of pain control.** Nat Rev Neurosci 2: 83-91, 2001.
- HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. **Intrathecal morphine in mice: a new technique.** Eur. J. Pharmacol. 67:313–316, 1980.
- IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor. IASP taxonomy. Pain terms. 2012. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576> Acesso em 27 julho de 2015.
- ILSE, W.K. **Neuropathic pain: Mechanisms, diagnosis and treatment.** Can. J. Continuing Med. Education 14: 99-108, 2002.
- ITO, Y.; YAMAMOTO, M.; LI, M.; DOYU, M.; TANAKA, F.; MUTCH, T.; MITSUMA, T.; SOBUE, G. **Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves.** Brain Res 793: 321–327, 1998.
- JAGGI, A.S.; SINGH N. **Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy.** Toxicology 291: 1-9, 2012.
- JÄNIG, W.; LEVINE, J.D. Autonomic, endocrine and immune interactions in acute and chronic pain. In: _____; MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M.; TRACEY, I.; TURK, D.C. **Wall & Melzack's Textbook of Pain.** Philadelphia: Elsevier, 2013, p. 203.
- JENSEN, T.S.; BARON, R. **Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain.** Pain 102: 1-8, 2003.
- JJ, R.R.; STRICHARTZ, G. **Cell signaling and the genesis of neuropathic pain.** Sci STKE reE14, 2004.
- JJ, R.R.; XU, Z.Z.; GAO, Y.J. **Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain.** Nat Rev Drug Discov 3:533-548, 2014.
- JIN, T.; XU, X.; HERELD, D. **Chemotaxis, chemokine receptors and human disease.** Cytokine 44(1): 1-8, 2008.
- JOHANNES, C.B.; LE, T.K.; ZHOU, X.; JOHNSTON, J.A.; DWORKIN, R.H. **The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey.** J Pain 11:1230-1239, 2010.
- JOHNSTON, B.; BURNS, A.R.; SUEMATSU, M.; ISSEKUTZ, T.B.; WOODMAN, R.C.; KUBES, P. **Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1.** J. Clin. Invest. 103, 1269–1276, 1999.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. **Molecular mechanisms of nociception.** Nature 413: 203-210, 2001.

- KAUPPILA, T. **Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain.** *Neurosci Biobehav Rev* 23:111-129, 1998.
- KAWASAKI, Y.; ZHANG, L.; CHENG, J.K.; JI, R.R. **Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord.** *J Neurosci* 28: 518951-94, 2008.
- KEHLET, H.; JENSEN, T.S.; WOOLF, C.J. **Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention.** *Lancet* 367: 1618-1625, 2006.
- KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. **Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors.** *J Neurophysiol.* 81:1104-1112, 1999.
- KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, Y.; KISHIOKA, S. **Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain.** *Curr.Opin.Pharmacol.* 12: 55-61, 2012.
- KIM, C.F.; MOALEM-TAYLOR, G. **Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice.** *Brain Res* 1405: 95–108, 2011.
- KIM, C.F.; MOALEM-TAYLOR, G. **Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice.** *J. Pain* 12: 370-383, 2011.
- KIM, C.H. **Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking.** *Curr. Drug Targets:* 343-361, 2004.
- KIM, S.H.; CHUNG, J.M. **An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.** *Pain* 50:355-363, 1992.
- KNALL, C.; WORTHEN, G.S.; JOHNSON, G.L. **Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases.** *Proc Natl AcadSci U S A.* 94(7):3052-7, 1997.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. **Neutrophils: Cinderella of innate immune system.** *Int Immunopharmacol* 10:1325–34, 2010.
- KUNER R. **Central mechanisms of pathological pain.** *Nat. Med.* 16: 1258-1266, 2010.
- LE, Y.; ZHOU, Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J.M. **Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease.** *Cell & Molec Immunol* 1(2): 95-104, 2004.
- LEDEBOER, A.; SLOANE, E.M.; MILLIGAN, E.D.; FRANK, M.G.; MAHONY, J.H.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. **Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation.** *Pain* 115: 71-83, 2005.

- LEDEBOER, A.; JEKICH, B.M.; SLOANE, E.M.; MAHONEY, J.H.; LANGER, S.J.; MILLIGAN, E.D.; MARTIN, D.; MAIER, S.F.; JOHNSON, K.W.; LEINWAND, L.A.; CHAVEZ, R.A.; WATKINS, L.R. **Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel- induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats.** *Brain Behav. Immun.* 21: 686-98, 2007.
- LEE, H.L.; LEE, K.M.; SON, S.J.; HWANG, S.H.; CHO, H.J. **Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model.** *Neuroreport* 15: 2807-2811, 2004.
- LEE, S.; ZHANG, J. **Heterogeneity of macrophages in injured trigeminal nerves: Cytokine/chemokine expressing vs. phagocytic macrophages.** *Brain Behav. Immun.* 26, 891–903 , 2012.
- LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; HARTUNG, T.; SOMMER, C. **Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury.** *Brain Res.* 866: 15-22, 2000.
- LINDIA, J.A.; MCGOWAN, E.; JOCHNOWITZ, N.; ABBADIE, C. **Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain.** *J Pain* 6:434–438, 2005.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. **Pain: an overview.** *Lancet* 353: 1607-9, 1999.
- LOESER, J.D. **What's to be done?** Comments on Grabow et al. *Clin J Pain* 19:384, 2003.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** *Pain* 137: 473-477, 2008.
- LUSTER, A.D. **Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation.** *N Engl J Med* 338: 436-45, 1998.
- MA, W.; QUIRION, R. **Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E from invading macrophages following nerve injury: an in vivo and in vitro study.** *J. Neurochem.* 93, 664–673, 2005.
- MACFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. **Chronic neuropathic pain and its control by drugs.** *Pharmacol.Ther.* 75: 1-19, 1997.
- MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. **Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates.** *Pain* 76: 215-222, 1998.
- MANJAVACHI, M.N.; QUINTÃO, N.L.; CAMPOS, M.M.; DESCHAMPS, I.K.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; LEAL, P.C.; CALIXTO, J.B. **The effects of the selective and nonpeptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice.** *Eur. J. Pain* 14: 23-31, 2010a.
- MANJAVACHI, M.N.; MOTTA, E.M.; MAROTTA, D.M.; LEITE, D.F.; CALIXTO, J.B. **Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice.** *Pain* 151 (2), 345-355, 2010b.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. **Role of the immune system in chronic pain.** *Nat Neurosci* 6:521-532, 2005.

- MAROTTA, D.M.; COSTA, R.; MOTTA, E.M.; FERNANDES, E.S.; MEDEIROS, R.; QUINTÃO, N.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. **Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw.** *Biochem. Pharmacol.* 77: 1223-1235, 2009.
- MCMAHON, S.B.; MALCANGIO, M. **Current challenges in glia-pain biology.** *Neuron* 64: 46-54, 2009.
- MCMAHON, S.B.; PRIESTLEY, J.V. **Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives.** *Curr Opin Neurobiol* 5:616-624, 1995.
- MENÉNDEZ, L.; LASTRA, A.; HIDALGO A.; BAAMONDE A. **Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice.** *J. Neurosci. Methods.* 113: 91-107, 2002.
- MENNICKEN, F.; MAKI, R.; DE SOUZA, E.B.; QUIRION, R. **Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning.** *Trends Pharmacol Sci* 20:73-78, 1999.
- MILLAN, M.J. **The induction of pain: An integrative review.** *ProgNeurobiol* 57:1-64, 1999.
- MILLIGAN, E.D.; TWINING, C.; CHACUR, M.; BIEDENKAPP, J.; O'CONNOR, K.; POOLE, S.; TRACEY, K.; MARTIN, D.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. **Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats.** *J Neurosci* 23: 1026-1040, 2003.
- MILLIGAN, E.D.; ZAPATA, V.; CHACUR, M.; SCHOENIGER, D.; BIEDENKAPP, J.; O'CONNOR, K.A.; VERGE, G.M.; CHAPMAN, G.; GREEN, P.; FOSTER, A.C.; NAEVE, G.S.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. **Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats.** *Eur J Neurosci* 20:2294-2302, 2004.
- MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. **Pathological and protective roles of glia in chronic pain.** *Nat Rev Neurosci* 10: 23-36, 2009.
- MILLS, C.D.; HAINS, B.C.; JOHNSON, K.M.; HULSEBOSCH, C.E. **Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury in rat.** *J Neurotrauma* 18:743-756, 2001.
- MINES, M.; DING, Y.; FAN, G.H. **The many roles of chemokine receptors in neurodegenerative disorders: emerging new therapeutical strategies.** *Curr Med Chem* 14:2456-2470, 2007.
- MOALEM, G.; TRACEY, D.J. **Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain.** *Brain Res. Rev.* 51: 240-264, 2006.
- MOALEM, G.; XU, K.; YU, L. **T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats.** *Neuroscience* 129: 767-77, 2004.
- MOGIL, J.S.; WILSON, S.G.; BON, K.; LEE, S.E.; CHUNG, K.; RABER, P.; PIEPER, J.O.; HAIN, H.S.; BELKNAP, J.K.; HUBERT, L.; ELMER, G.I.; CHUNG, J.M.; DEVOR, M. **Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception.** *Pain* 80:67-82, 1999.
- MOGIL, J.S. **Animal models of pain: progress and challenges.** *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 283-294, 2009.

- MOGIL, J.S.; DAVIS, K.D.; DERBYSHIRE, S.W. **The necessity of animal models in pain research.** *Pain* 151:12-17, 2010.
- MORIN, N.; OWOLABI, S.A.; HARTY, M.W.; PAPA, E.F.; TRACY JR., T.F.; SHAW, S.K.; KIM, M.; SAAB, C.Y. **Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve.** *J. Neuroimmunol.* 184: 164-171, 2007.
- MURPHY, P.M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; BERT, C. A. H.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J.J.; POWER, C. A. **International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors.** *Pharmacol Rev.* 52:145-76, 2000.
- NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. **A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia.** *Eur J Pharmacol.* 135:145-153, 1987.
- NANJUNDAIAH, S.M.; STAINS, J.P.; MOUDGIL, K.D. **Kinetics and interplay of mediators of inflammation-induced bone damage in the course of adjuvant arthritis.** *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26:37-48, 2013.
- NICHOLSON, B. **Gabapentin use in neuropathic pain syndromes.** *ActaNeurolScand* 101: 359-71, 2000.
- OCEAN, A.J.; VAHDAT, L.T. **Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies.** *Support. Care Cancer* 12, 619–625, 2004.
- OCHI-ISHI R, NAGATA K, INOUE T, TOZAKI-SAITOH H, TSUDA M, INOUE K. **Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia.** *Mol Pain* 10:53-59, 2014.
- O'CONNOR, A.B.; DWORKIN, R.H. **Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines.** *Am. J. Med.* 122: S22-S32, 2009.
- OHTORI, S.; TAKAHASHI, K.; MORIYA, H.; MYERS, R.R. **TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord.** *Spine* 29: 1082-1088, 2004.
- OKAMOTO, K.; MARTIN, D.P.; SCHMELZER, J.D.; MITSUI, Y.; LOW, P.A. **Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain.** *Exp. Neurol.* 169: 386-391, 2001.
- OSSIPOV, M.H.; BIAN, D.; MALAN JR., T.P.; LAI, J.; PORRECA, F. **Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats.** *Pain* 79:127-133, 1999.
- PERKINS, N.M.; TRACEY, D.J. **Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils.** *Neuroscience* 101: 745-757, 2000.
- PERRIN, F.E.; LACROIX, S.; AVILÉS-TRIGUEROS, M.; DAVID S. **Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1a and interleukin-1b in Wallerian degeneration.** *Brain* 128:854-866, 2005.
- PITCHER, G.M.; RITCHIE, J.; HENRY, J.L. **Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain.** *Pain* 83:37-46, 1999.
- PRICE, D.D. **Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain.** *Mol Interv* 2:392-403, 2002.

- PODRATZ, J.L.; KNIGHT, A.M.; TA, L.E.; STAFF, N.P.; GASS, J.M.; GENELIN, K. **Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons.** *Neurobiol. Dis.* 41:661–668, 2011.
- POLOMANO R.C.; MANNES A.J.; CLARK U.S.; BENNETT G.J. **A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel.** *Pain* 94: 293-30, 2001.
- QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H.P. **Chemotherapy-induced peripheral neuropathy.** *J. Neurol* 249: 9–17, 2002.
- QUINTÃO, N.L.M.; MEDEIROS, R.; SANTOS, A.R.S.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. **Effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice.** *Anesth. Analg.* 101: 1763-1769, 2005.
- QUINTÃO, N.L.; BALZ, D.; SANTOS, A.R.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. **Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha.** *Neuropharmacology* 50: 614-620, 2006.
- RAEBURN, C.D.; CALKINS, C.M.; ZIMMERMAN, M.A.; SONG, Y.; AO, L.; BANERJEE, A.; HARKEN, A.H.; MENG, X. **ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R477-R486, 2002.
- REN, K.; DUBNER, R. **Interactions between the immune and nervous systems in pain.** *Nat. Med.* 16: 1267-1276, 2010.
- REUTERSHAN, J. **CXCR2-The Receptor to Hit?** *Drug News Perspect* 19: 1-9, 2006.
- RICHARDSON, R.M.; ALI, H.; PRIDGEON, B.C.; HARIBABU, B.; SNYDERMAN R. **Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation.** *J Biol Chem* 273:10690-5, 1998.
- RIEDEL, W.; NEECK, G. **Nociception, pain and antinociception: current concepts.** *Z. Reumatol.* 60: 404-415, 2001.
- RUSO, C.M.; BROSE, W.G. **Chronic pain.** *Ann Rev Med* 49: 123-133, 1998.
- SAVARIN-VUAILLAT, C.; RANSOHOFF, R.M. **Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce?** *Neurotherapeutics* 4: 590-601, 2007.
- SCHAFERS, M.; LEE, D.H.; BRORS, D.; YAKSH, T.L.; SORKIN, L.S. **Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation.** *J Neurosci* 23: 3028-3038, 2003.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. **The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.** *Nat. Neurosci.* 10: 1361-1368, 2007.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. **A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury.** *Pain* 43: 205-218, 1990.
- SELTZER, Z. **The relevance of animal neuropathy models for chronic pain in humans.** *Neurosci* 7:211-219, 1995.

- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. **The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta.** *J. Neurosci.* 22: 3052-3060, 2002.
- SHEA-DONOHUE, T.; THOMAS, K.; CODY, M.J.; ZHAO, A.; DETOLLA, L.J.; KOPYDLOWSKI, K.M.; FUKATA, M.; LIRA, S.A.; VOGEL, S.N. **Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (CXCL1/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis.** *Innate Immun.* 14: 117-124, 2008.
- SHIR, Y.; SELTZER, Z. **A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalinform pain disorders in rats.** *Neurosci.Lett.* 115: 62-67, 1990.
- SHUBAYEV, V.I.; MYERS, R.R. **Upregulation and interaction of TNFalpha and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury.** *Brain Res* 855:83-9, 2000.
- SIAU, C.; XIAO, W.; BENNETT, G.J. **Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells.** *Exp. Neurol.* 201: 507-14, 2006.
- SKÖTT, O. **Pain: New insights, new treatments?** *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol* 285:30-31, 2003.
- SMITH, L.J.; SHIH, A.; MILETIC, G.; MILETIC, V. **Continual systemic infusion of lidocaine provides analgesia in an animal model of neuropathic pain.** *Pain* 97: 267-273, 2002.
- SMITH S.B.; CRAGER S.E.; MOGIL J.S. **Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains.** *Life Sci.* 74: 2593-604, 2004.
- SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. **Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1.** *Exper. Neurol.* 151: 138-142, 1998.
- SOMMER, C.; PETRAUSCH, S.; LINDENLAUB, T.; TOYKA, K.V. **Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy.** *Neurosci. Lett.* 270: 25-28, 1999.
- SOMMER, C.; LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; SCHÄFERS, M.; HARTUNG, T.; TOYKA, K.V. **Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy.** *Brain Res.* 913: 86-89, 2001.
- SOMMER, C.; KRESS, M. **Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.** *NeurosciLett* 361: 184-187, 2004.
- STEIN, C.; MILLAN, M.J.; HERZ, A. **Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds.** *Pharmacol Biochem Behav* 2:445-451, 1988.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. **Attacking pain at its source: new perspectives on opioids.** *Nature Med* 9: 1003-1008, 2003.
- STREIT, W.J. **Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS.** *Glia* 40: 133-139, 2002.

- SWEITZER, S.M.; HICKEY, W.F.; RUTKOWSKI, M.D.; PAHL, J.L.; DELEO, J.A. **Focal peripheral nerve injury induces leukocyte trafficking into the central nervous system: potential relationship to neuropathic pain.** *Pain* 100: 163-170, 2002.
- TANAKA, T.; MINAMI, M.; NAKAGAWA, T.; SATOH, M. **Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain.** *Neurosci. Res.* 48: 463-469, 2004.
- TANG, N.K.; CRANE, C. **Suicidality in chronic pain: a review of the prevalence, risk factors and psychological links.** *Psychol Med* 36:575-586, 2006.
- THACKER, M.A.; CLARK, A.K.; MARCHAND, F.; MCMAHON, S.B. **Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules.** *Anesth. Analg.* 105: 838-847, 2007.
- THACKER, M.A.; CLARK, A.K.; BISHOP, T.; GRIST, J.; YIP, P.K.; MOON, L.D.; THOMPSON, S.W.; MARCHAND, F.; MCMAHON, S. **CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states.** *Eur J Pain* 13:263-272, 2009.
- THURSTON, D.E. **Chemistry and pharmacology of anticancer drugs.** Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group 2006, p. 290.
- TODD, A.J. **Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn.** *Nat. Rev. Neurosci.* 11: 823-836, 2010.
- TOEWS, A.D.; BARRETT, C.; MORELL, P. **Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve.** *J. Neurosci. Res.* 53: 260-267, 1998.
- TSUDA, M.; INOUE, K.; SALTER, M.W. **Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia.** *Trends Neurosci* 28: 101-107, 2005.
- VADALOUCA, A.; SIAFAKA, I.; ARGYRA, E.; VRACHNOU, E.; MOKA, E. **Therapeutic management of chronic neuropathic pain: an examination of pharmacologic treatment.** *Ann N Y AcadSci* 1088: 164-186, 2006.
- VERGE, G.M.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R.; NAEVE, G.S.; FOSTER, A.C. **Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions.** *Eur J Neurosci* 20: 1150-1160, 2004.
- VERRI JR., W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?** *Pharmacol. Ther.* 112: 116-138, 2006.
- VIANNA, F.A.B. **Guia terapêutico veterinário.** 2 ed. Lagoa Santa: Editora Cem., 2007, p. 462.
- WAGNER, R.; MYERS, R.R. **Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors.** *Neuroreport.* 7:2897-901, 1996.
- WALL, P.D.; SCADDING, J.W.; TOMKIEWICZ, M.M. **The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa.** *Pain* 6:175-182, 1979.

- WANG, L.X.; WANG, Z.J. **Animal and cellular models of chronic pain.** *Adv. Drug Delivery Rev* 55:949-965, 2003.
- WAUGH, D.J.; WILSON, C. **The interleukin-8 pathway in cancer.** *Clin Cancer Res.* 14(21):6735-41, 2008.
- WHITE, F.A.; BHANGOO, S.K.; MILLER, R.J. **Chemokines: integrators of pain and inflammation.** *Nature Rev Drug Discov* 4:834-844, 2005.
- WOOLF C.J. **Overcoming obstacles to developing new analgesics.** *Nat. Med.* 16: 1241-1247, 2010.
- WOOLF, C.J. **Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain.** *Pain* 152:S2-15, 2011.
- WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** *Lancet* 353: 1959-64, 1999.
- WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. **Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.** *Science* 288:1765-1769, 2000.
- WU, D.; LAROSA, G.J.; SIMON, M.I. **G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8.** *Science* 261(5117):101-103, 1993.
- YASAKA, T.; TIONG, S.Y.; HUGHES, D.I.; RIDDELL, J.S.; TODD, A.J. **Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach.** *Pain* 151:475-488, 2010.
- XIAO, W.H.; ZHENG, H.; ZHENG, F.Y.; NUYDENS, R.; MEERT, T.F.; BENNETT, G.J. **Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat.** *Neuroscience* 199: 461-469, 2011.
- ZELENKA, M.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. **Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain.** *Pain* 116: 257-263, 2005.
- ZHANG, J.; DE KONINCK, Y. **Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury.** *J Neurochem* 97:772-783, 2006.
- ZHANG, J.; SHI, X.Q.; ECHEVERRY, S.; MOGIL, J.S.; DE KONINCK, Y.; RIVEST, S. **Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain.** *J Neurosci* 27:12396-406, 2007.
- ZHANG, Z.J.; CAO, D.L.; ZHANG, X.; JI, R.R.; GAO, Y.J. **Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons.** *Pain* 154:2185-2197, 2013.
- ZHENG, H.; XIAO, W.H.; BENNETT, G.J. **Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy.** *Exp. Neur.* 238:225-234, 2012.
- ZHOU, Y.Q.; GAO, H.Y.; GUAN, X.H.; YUAN, X.; FANG, G.G.; CHEN, Y.; YE, D.W. **Chemokines and their receptors: potential therapeutic targets for bone cancer pain.** *Curr Pharm Des* [Epub ahead of print], 2015.

- ZHUANG, Z.Y.; KAWASAKI, Y.; TAN, P.H.; WEN, Y.R.; HUANG, J.; JI, R.R. **Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine.** Brain BehavImmun 21:642–651, 2007.
- ZIMMERMANN, M. **Pathobiology of neuropathic pain.** Eur J Pharmacol 429:23–37, 2001.
- ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. **Chemokines: a new classification system and their role in immunity.** Immunity 12: 121-127, 2000.
- ZUO, Y.; PERKINS, N.M.; TRACEY, D.J.; GECZY, C.L. **Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells.** Pain 105: 467–79, 2003.